

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEDEUTUNG
VON PROLIFERATION UND
DNA-BASENALKYLIERUNG IN VER-
SCHIEDENEN ABSCHNITTEN DER RATTEN-
LEBER BEI DER INDUKTION
DER CHEMISCHEN CANCEROGENESE

Jutta Fronius-Jancso

1983

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEDEUTUNG VON
PROLIFERATION UND DNA-BASENALKYLIERUNG IN VER-
SCHIEDENEN ABSCHNITTEN DER RATTENLEBER BEI DER INDUKTION
DER CHEMISCHEN CANCEROGENESE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jutta Fronius-Jancso
aus
München

1982

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Professor Dr. Max Eder

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

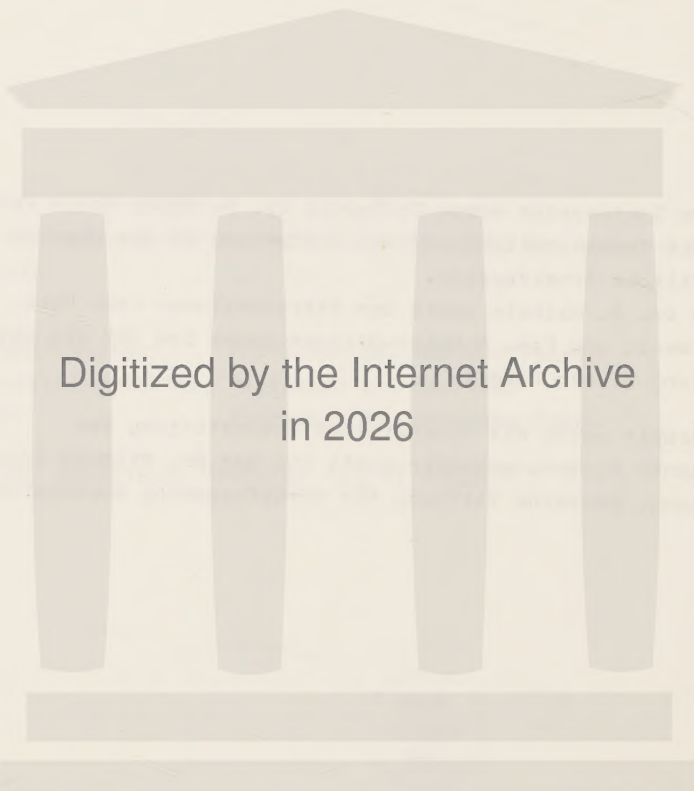
Tag der mündlichen Prüfung: 13. 1. 1983



Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. H. Rabes danke ich für die Themenstellung und die Einführung in die wissenschaftliche Arbeitsweise.

Herrn Dr. R. Wilhelm sowie den Assistentinnen Frau Rode, Frau Wendt und Frau Schmied-Nielson danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr. Mildred Scheel-Stiftung, Deutsche Stiftung für Krebsforschung durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

Teil I: Autoradiographische Untersuchungen zur Bedeutung der Zellproliferation für die Lebertumorinduktion durch Diäthylnitros- amin (DÄNA)	Seite
1. ALLGEMEINER TEIL	
1.1. Eigenschaften der Nitrosamine	1
1.2. Wirkungen der Nitrosamine	2
1.2.1. Toxische Wirkungen	2
1.2.2. Cancerogene Wirkungen	2
1.2.3. Die Entstehung von Enzymdefektbezirken	4
1.2.4. Zusammenhang zwischen Enzymdefektbezir- ken und Karzinomentstehung	6
1.2.5. Weitere intrazelluläre Veränderungen auf dem Weg vom Enzymdefektbezirk zum Karzinom	7
1.3. Die Rolle der Zellproliferation bei der Cancerogenese	8
1.3.1. Zellzyklusphasen	8
1.3.2. Proliferationskinetik der Rattenleber	8
1.3.3. Zellproliferation und Tumorwachstum	12
1.4. Fragestellung und Skizzierung des Ver- suchsmodells	14
2. MATERIAL UND METHODE	
2.1. Verwendete Versuchstiere, DÄNA-Fütterung	16
2.2. Markierung mit ^3H -Thymidin	16
2.3. Tötung der Tiere und Leberentnahme	17
2.4. Anfertigung der histologischen Präparate und der Autoradiographien	17
2.5. Auswertung der Autoradiographien	17

3.	ERGEBNISSE	Seite
3.1.	Markierungsindex der Hepatozyten in den einzelnen Leberlobi	20
3.2.	Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der DÄNA-expo- nierten Tiere mit denen des Lobus dex- ter lateralis derselben Tiere	22
3.3.	Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der Kontroll- tiere mit denen des Lobus dexter late- ralis derselben Tiere	24
3.4.	Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der DÄNA-expo- nierten Tiere mit dem der nicht vorbe- handelten Kontrolltiere	24
4.	DISKUSSION	
4.1.	Zur Methode der ^3H -Thymidin-Markierung	26
4.2.	Zur Bestimmung der Markierungsindices	27
4.3.	Überlegungen zum vermehrten Auftreten von Enzymdefektbezirken im Lobus si- nister lateralis	29

Teil II: Biochemische Untersuchungen zur Bedeutung der DNA-Alkylierung für die Lebertumorinduktion durch Dimethylnitrosamin (DMN)	Seite
1. ALLGEMEINER TEIL	
1.1. Zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Nitrosamine	32
1.1.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung	32
1.1.2. Metabolismus der Nitrosamine	33
1.1.3. Basenalkylierung; Bedeutung der einzelnen Alkylierungsprodukte, insbesondere O ⁶ -Alkyl-Guanin	35
1.1.4. Persistenz des O ⁶ -Alkyl-Guanins	38
1.1.5. Bedeutung von Reparaturmechanismen und deren Irrtumsanfälligkeit für die Carcinogenese	39
1.2. Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells	46
2. MATERIAL UND METHODE	
2.1. Versuchstiere	48
2.2. DMN-Lösung	48
2.3. Tötung der Tiere und Leberentnahme	48
2.4. DNA-Isolierung	49
2.5. Säulenchromatographie und photometrische Messungen	51
2.6. Radioaktivitätsnachweise	52
3. ERGEBNISSE	
3.1. Ausbeute an DNA-Lebergewicht	53
3.2. Berechnung der Gesamtmenge Adenin und Guanin und ihre Bedeutung	53
3.3. Berechnung der Aktivität der einzelnen Fraktionen in dpm	56

	Seite
3.4.	Erläuterung der Radiochromatogramme anhand eines Beispiels 58
3.5.	Vergleich der entsprechenden Alky- lierungsprodukte und des Quotienten O^6 -/7-Methyl-Guanin nach Leberlappen 62
3.6.	Bedeutung von ^{14}C -Adenin und ^{14}C -Guanin 64
3.7.	Zusammenfassung der wichtigsten Ergeb- nisse 64
4.	DISKUSSION
4.1.	Mögliche Ursachen der erhöhten Alky- lierung der DNA im Processus caudatus und im Processus papillaris 66
4.2.	Zum Quotienten O^6 -/7-Methyl-Guanin 68
4.3	Direkter Vergleich Lobus sinister la- teralis - Lobus dexter lateralis 69
4.4.	Zur Bedeutung des gebildeten O^6 -Methyl- Guanins und seiner Eliminierung für die Lebercancerogenese 70
5.	ZUSAMMENFASSUNG 74
6.	LITERATURVERZEICHNIS 78
7.	LEBENS LAUF 95

Abkürzungen

RNS (RNA)	Ribonukleinsäure
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure
EDB	Enzymdefektbezirk
DMN	Dimethylnitrosamin
DÄNA	Diäthylnitrosamin
NEU	N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoff
NMU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
O^6 -MeGua	O^6 -Methyl-Guanin
7-MeGua	7-Methyl-Guanin
3-MeAd	3-Methyl-Adenin
G ₁ -Phase	Präsynthetische Ruhephase
S-Phase	DNS-Synthesephase
G ₂ -Phase	Postsynthetische Ruhephase, vor der Mitose
G ₀ -Phase	Zellen in potentiell reversibler Proliferationsruhe
t _S	Dauer der S-Phase
KG	Körpergewicht
LG	Lebergewicht
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient

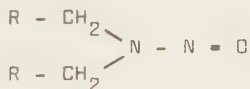
Teil I : Autoradiographische Untersuchungen zur Bedeutung
der Zellproliferation für die Lebertumorinduktion
durch Diäthylnitrosamin (DÄNA)

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Eigenschaften der Nitrosamine

Magee und Barnes (1956) entdeckten als erste die cancerogene Wirkung von Nitrosaminen. Sie stellten fest, daß sich durch einmalige Applikation von Dimethylnitrosamin (DMN) bei Ratten Nierentumore erzeugen lassen. In den folgenden Jahren untersuchten insbesondere Druckrey et.al. (1967) eine Vielzahl von Nitroso-Verbindungen auf ihre cancerogene Wirkung.

Als Nitroso-Derivate sekundärer Amine besitzen die Dialkylnitrosamine die chemische Formel



R = H = Dimethylnitrosamin

R = CH₃ = Diäthylnitrosamin

Als Dialkylamide der salpetrigen Säure besitzen sie praktisch keine Basizität und lösen sich in Wasser mit neutraler Reaktion. Sie bilden leicht Wasserstoffbrücken über den Nitroso-Sauerstoff. Sie werden in saurer Lösung,

meist unter Erwärmung, zu sekundären Aminen hydrolisiert. Darüberhinaus sind sie relativ stabil, solange sie im Dunkeln aufbewahrt werden (Druckrey 1967, Magee und Barnes 1967).

Ihre Löslichkeit in Wasser -die beste besitzt Diäthylnitrosamin (DÄNA)- ermöglicht im Tierversuch eine exakte Dosierung im Trinkwasser. Ferner kumulieren die niederkettigen Dialkylnitrosamine nicht im Fettgewebe und sind daher in ihrer Wirkung vom unterschiedlichen Fettgehalt der Versuchstiere unabhängig (Druckrey 1961, Schmährl 1962).

1.2. Wirkungen der Nitrosamine

1.2.1. Toxische Wirkung

Die Nitrosamine haben eine primär toxische Wirkung auf die Leber, wo sie zentrolobuläre Nekrosen und Haemorrhagen erzeugen. Ferner kommt es zu Haemorrhagien in der Lunge, haemorrhagischem Ascites und Darmblutungen (Magee und Barnes 1967). Die mittlere letale Dosis bei einmaliger oraler Gabe beträgt 210 mg DMN/kg KG (Schmährl 1960). Dabei zeigt DMN die stärkste Toxizität, aber auch langkettige cyclische Verbindungen haben derartige Veränderungen zur Folge. Die erforderliche Gesamtdosis nimmt mit der Anzahl der C-Atome zu (Druckrey et.al.1961).

1.2.2. Cancerogene Wirkung

Wird DMN oder DÄNA in kleiner Konzentration über einen längeren Zeitraum an Ratten verfüttert, so entwickeln die

Tiere Leberkarzinome. Es handelt sich überwiegend um hepatozelluläre Karzinome, begleitet von Gallengangshyperplasien. Die ursprüngliche Leberstruktur wird zerstört, Metastasen finden sich überwiegend in der Lunge und im Abdomen, es kommt zu Haemorrhagien und die Tiere verbluten letztlich (Schmährl 1960, Thomas 1961, Magee und Barnes 1967). Insbesondere DÄNA führt zur Entstehung von Lebertumoren bei einer Vielzahl von Spezies (Magee und Barnes 1967; Magee, Pegg und Swann 1975). Wird dagegen nur eine einmalige Dosis Nitrosamin verabfolgt, so entstehen nur ganz selten Lebertumore, abgesehen von den Fällen, in denen durch vorangegangene partielle Hepatektomie ein Regenerationsstimulus gesetzt wurde (Craddock 1973). In der Niere jedoch können durch eine einmalige hohe Dosis Tumore erzeugt werden (Magee und Barnes 1956, 1967).

Allgemein ist die Höhe der zur Tumorerzeugung notwendigen mittleren Gesamtdosis abhängig von der Tagesdosis. Sie sinkt mit kleiner werdender Tagesdosis und Zunahme der Applikationszeit. Das heißt, auch ganz geringe Dosen über lange Zeit verabfolgt würden Tumore erzeugen, wenn das Tier nicht schon vorher aufgrund der allgemeinen Lebenserwartung sterben würde. Die erforderliche Gesamtdosis sinkt ferner mit der Zahl der C-Atome des Nitrosamins (Druckrey 1961).

Zwischen akuter Toxizität der Nitrosamine und ihrer cancerogenen Wirkung besteht kein Zusammenhang. Bei toxischen Dosen sterben die Tiere entweder innerhalb von zwei bis

vier Tagen oder aber sie zeigen im Falle des Überlebens nach einigen Wochen eine vollkommene Wiederherstellung des Lebergewebes (Magee und Barnes 1967). Die neoplastischen Veränderungen dagegen sind irreversibel. Die Spezifität der cancerogenen Wirkung ist um so größer, je kleiner die cancerogen wirksame Dosis der LD_{50} ist (Druckrey 1967).

1.2.3. Die Entstehung von Enzymdefektbezirken

Der mikroskopisch, später makroskopisch sichtbaren Tumorentstehung gehen in der Leber sogenannte Enzymdefektbezirke voraus, die -wie histochemische Untersuchungen von Leberschnitten zeigen- Abweichungen von normalen Enzymaktivitätsmustern der Leber aufweisen. Zur Untersuchung dieser Veränderungen sind besonders die Glucose - 6 - Phosphatase und die Adenosintriphosphatase geeignet. Sie werden nach der Methode von Wachstein und Meisel (1956) nachgewiesen.

Die Glucose - 6 - Phosphatase ist ein Schlüsselenzym im Kohlehydratstoffwechsel. Ihre Aktivität nimmt innerhalb eines Leberläppchens vom Portalfeld zum Läppchenzentrum hin ab (Wachstein und Meisel 1957, Rabes 1970). Die Adenosintriphosphatase spielt eine bedeutende Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen und bei Synthesen im Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel. Sie hat ein der Glucose - 6 - Phosphatase ähnliches Verteilungsmuster innerhalb des Leberläppchens. Nach Fütterung von 8 mg DÄNA/kg KG/Tag kommt

es bereits nach wenigen Tagen zu einem Ausfall der Enzymreaktionen rund um die Zentralvene, die zu sogenannten "Straßen" konfluieren (Friedrich-Frekса 1969). Auch im Bereich der Glissonschen Felder treten solche "Straßen" auf. Sie sind, wenn die Behandlung abgebrochen wird, voll rückbildungsfähig .

Wird die Dosis von 8 mg/kg KG/Tag über vier Wochen gegeben, so kommt es nach weiteren vier Wochen Latenzzeit zum Auftreten der ersten Enzymdefektbezirke, die scharf gegen die Umgebung abgesetzt und nicht mehr reversibel sind (Schauer und Kunze 1966, Friedrich-Frekса 1969). Man spricht von sogenannten "Inseln". Zwischen der Cancerogenkonzentration und der Zeit bis zum Auftreten der ersten Inseln besteht bei kontinuierlicher Verabreichung eine lineare Beziehung (Friedrich-Frekса 1969), nicht dagegen bezüglich der Karzinomentstehung.

Die Inseln wachsen nach Absetzen der Cancerogenfütterung mehrere Wochen langsam weiter und gehen dann plötzlich in rasche Proliferation über (Friedrich-Frekса 1969, Rabes und Zettler 1974). Die Gesamtzellzykluszeit sinkt, der mittlere Markierungsindex steigt mit zunehmender Größe der EDB (Rabes 1979). Mit dem Ansteigen der endogenen Proliferation verlieren die Inseln aber die Fähigkeit auf Wachstumsreize - z.B. partielle Hepatektomie - mit einem Anstieg der Zellproliferation zu reagieren (Rabes 1970, 1979). Das autonome Wachstum hat damit begonnen. Die ersten Tumore entstehen dann nach einer Gesamtzeit von 112

Tagen nach Beginn der Fütterung im Beispiel der Dosierung von 8 mg/kg/Tag. Bei kontinuierlicher DÄNA-Fütterung in einer Konzentration von 5 mg/kg KG/Tag beträgt die mittlere Überlebenszeit 137 Tage (Rabes 1979).

Die Frage, ob die Inseln klonal entstehen, d.h. durch Proliferation einer geschädigten Zelle oder aber durch die Zellteilung einer alterierten Zellgruppe, kann durch enzymhistochemische Untersuchungen nicht beantwortet werden, da sie nicht bis zur Einzelzelle zurückverfolgt werden können.

1.2.4. Zusammenhang zwischen Enzymdefektbezirk und Karzinomentstehung

Zwischen den EDB und den später entstehenden Tumoren besteht ein, im Einzelnen zwar noch nicht endgültig geklärt, aber doch sicherer kausaler Zusammenhang. Beispielsweise erzeugen nur cancerogene Stoffe EDB in der Leber. Ferner treten im Lobus sinister lateralis, dem Leberlappen, in dem zuerst und vermehrt Tumore entstehen, vermehrt EDB auf. Auch weisen die Inseln nach einer bestimmten Latenzzeit eine plötzlich einsetzende Proliferationswelle auf (Rabes und Zettler 1974). Scherer und Emmetot (1975) stellen eine klare Beziehung zwischen kleinen Tumoren und Resten von Inselgewebe fest. Schieferstein et.al. (1974) wiesen eine erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit der Inseln nach. Friedrich-Frekso (1969) allerdings fand keine so eindrucksvolle Übereinstimmung der Lokalisation von EDB und

späteren Tumoren.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß Enzymdefekte, wie der Ausfall der Glucose - 6 Phosphatase und der Adenosintri-phosphatase eine so massive Zellschädigung darstellen, daß diese Zellen auch der Aufgabe der Wachstumsregulation nicht mehr gewachsen sind (Friedrich-Frekse 1969). Oder aber die Inselzellen bieten als sozusagen vorgeschädigte Zellen einen leichteren Angriffspunkt für weitere cancerogene Schäden (Scherer und Emmelott 1975).

1.2.5. Weitere Veränderungen auf dem Weg vom Enzymdefekt-bezirk zum Karzinom

In dem EDB kommt es - je nach Dosis - ab ca dem 70. Tag zur vermehrten Glykogenspeicherung, das jedoch aufgrund der Enzymdefekte im Hungerversuch nicht mehr mobilisiert werden kann (Bannasch 1967, Friedrich-Frekse 1969). Die Wende vom EDB zum Hepatom, d.h. zum Auftreten erster maligner Zellen, sogenannter Mikrokarzinome (gekennzeichnet durch cytoplasmatische Basophilie), ist gekennzeichnet von einem starken Glykogenschwund in diesen Zellen (Bannasch 1967, Friedrich-Frekse 1969). In dieser kritischen Phase kommt es ferner zu einem Anstieg der anaeroben Glykolyse (Fiala 1969), dem Hauptenergiestoffwechsel maligner Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Verminderung der Mitochondrien, des Ergastoplasmas und zu einer Vermehrung der Ribosomen (Bannasch 1967, Fiala 1969). Die Proteinsynthese und der Nucleinsäurestoffwechsel sind zu Beginn

der Nitrosaminverabreichung vermindert (Magee 1958, Bowers u. Emmelot 1960, Kröger u. Kessel 1968), in späteren Stadien der Cancerogenese ist die RNS-Synthese jedoch wieder gesteigert (Schauer u. Kunze 1968), ebenso steigt die DNS-Synthese an. Die Nukleasen fallen bis zu ihrem völligen Verlust ab, was auch in anderen malignen Tumoren beobachtet worden ist (Amano u. Daoust 1961).

Zur qualitativen Veränderung der Nukleinsäuren, ihrer Alkylierung, siehe unter Teil II.

1.3. Die Rolle der Zellproliferation bei der Cancerogenese

1.3.1. Zellzyklusphasen

1953 wurde von Howard und Pelc die Einteilung des Zellzyklus' in die Phasen G_1 - S - G_2 - M vorgeschlagen. G_1 ist die Präsynthesephase, S die DNS-Synthesephase, G_2 die Ruhephase vor der Mitose und M die Mitosephase. Als G_0 -Zellen bezeichnet man "non-cycling"-Zellen, die aber bei Bedarf in den Zellzyklus wieder eintreten können (Rajewsky 1972). Die Dauer der Zellzyklusphasen kann mit der Quastler - Sherman - Methode (1959) bestimmt werden.

Die DNA-Synthese im Rahmen des Zellzyklus unterliegt auch tageszeitlichen Schwankungen. Sie ist hoch um 6⁰⁰ früh, wird niedrig um 12⁰⁰ Uhr und 6⁰⁰ abends (Fabrikant 1968).

1.3.2. Proliferationskinetik der Rattenleber

Die Leber der jungen Ratte weist bis zum 4. Monat ein exponentielles Organwachstum auf, welches dann in ein Ersatz-

wachstum übergeht. Von einem mittleren Tiergewicht von 200 - 230 g an kann man bei der Rattenleber mit einem gleichbleibend niedrigem Prozentsatz der DNS-synthetisierenden Kerne rechnen (Stöcker 1964).

Die klassische Methode zur Untersuchung der Zellproliferation der Rattenleber ist das Setzen eines Regenerationsreizes durch partielle Hepatektomie. Die technischen Details wurden von Higgins und Andersson (1931) beschrieben. Die kompensatorische Zellantwort ist dabei abhängig von dem Ausmaß der Leberresektion: bei Entfernung von 8 - 9 % der Leber kommt es nur zu einer ganz geringgradigen Stimulation der Zellregeneration; bei 30 % zu einem etwas höheren Proliferationsplateau; bei 43 % zu einer schnellen Proliferation, bei 66 % zu einem noch steileren Proliferationspeak (Bucher u. Swaffield 1964); bei 82 % zu einer gegenüber dem 66 % - Wert um 10 Stunden verzögerten und bei 90 % bleibt die Proliferationsantwort aus (Tuczek u. Rabes 1971). Je nach Ausmaß der Leberresektion konkurrieren offenbar zwei Ziele miteinander: Proliferation zum Ersatz des Zellverlustes auf der einen, erhöhte metabolische Aufgaben der verbleibenden Parenchymzellen auf der anderen Seite (Rabes 1978, 1979).

Bei einer 2/3 - Hepatektomie ist der Parenchymverlust nach 72 Stunden wieder ausgeglichen (Rabes u. Brändle 1969). Nach 20 Stunden kommt es zu maximaler Zellproli-

feration im peripheren Drittel der Lobuli, wobei dort 80 % in der mittleren Zone 15 % und in dem der Zentralvene angrenzenden Bereich 5 % der Zellen markiert sind (Fabrikant 1968, Rabes 1976). Dieser Abfall nach zentral ist nach 27 Stunden weitgehend ausgeglichen. Nach 34 - 40 Stunden liegt das Maximum des Markierungsindex perivenös im Bereich des efferenten Gefäßpols. Nach einem Intervall folgt nach 56 Stunden eine zweite Proliferationswelle mit dem gleichen Verteilungsmuster (Rabes 1970, Tuczek u. Rabes 1973, Rabes 1970, 78, 79).

Die Zonen höchster Markierungsdichte entsprechen denen maximaler postnataler Proliferation (Stöcker 1968, 1972). Es wurde von vielen Autoren bei autoradiographischen Untersuchungen beobachtet, daß die zentralen Lobulusabschnitte viel träger proliferieren als die periportal (Stöcker 1966, Fabrikant 1968, Rabes 1970).

Das Auftreten der Proliferationsmaxima zeigt Parallelen zu der von Rappaport 1954 vorgeschlagenen Einteilung des Leberlobulus' in Abhängigkeit von den afferenten Blutgefäßen. Als Zone I bezeichnet er das Gebiet um die Art. hepatica und die terminalen Pfortaderäste. Das Gebiet ist gleichzusetzen dem periportal (Bereich) und hat die besten O_2 - und Nährstoffbedingungen. Zone II umgibt Zone I, Zone III liegt um die terminalen Äste der V. hepatica. Das legt nahe, daß das unterschiedliche Mikromilieu - innerhalb des Lobulus - insbesondere

der O_2 -Gradient im Blut von peripher nach perivenös den Ablauf der Proliferation entscheidend mit beeinflusst (Rabes u. Tuczek 1970, Tuczek u. Rabes 1973, Rabes 1976). In dieselbe Richtung weist auch die Beobachtung, daß zum Zeitpunkt der Geburt die DNA-Synthese über die Leberlobuli gleichmäßig verteilt ist, aber schon wenige Tage später sich eine Bevorzugung der Periportalfelder zeigt. Zur gleichen Zeit beginnt die postnatale Zelldifferenzierung und der Ersatz des Nabelvenenblutes durch arteriell-venös gemischtes Blut mit niedrigerem O_2 -Gehalt. Unterstützt wird diese Annahme ferner durch die Beobachtung, daß kurz nach der Teilhepatektomie in allen Lobulusgebieten gleichermaßen die RNA-Synthese ansteigt, d.h. der Übergang von der G_0 - in die G_1 -Phase stattfindet und erst kurz vor Beginn der DNA-Synthese sich die RNA-Syntheserate auf die Lobulusperipherie konzentriert (Rabes u. Brändle 1969). Sie ist periportal am kürzesten und wird perivenös immer länger, d.h. sie ist umgekehrt proportional zum sinkenden O_2 -Gradienten.

Desweiteren werden endogene Faktoren diskutiert: in der Periportalzone findet die Glukoneogenese und aerobe Energietransformation statt; die Zahl der Mitochondrien ist dort geringer, die einzelnen Mitochondrien sind aber größer und haben eine höhere Volumendichte. Die Aktivität der Succinatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase, Cytochromoxydase und Glutamat-Pyrovat-Transaminase ist größer. Zentrolobulär dagegen herrschen

Biosynthese und Glykolyse vor, enthalten die Zellen mehr glattes endoplasmatisches Retikulum, ist die Aktivität der Isocitratdehydrogenase, der Glutamatdehydrogenase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase dort höher (Rabes 1976, 1978).

Nicht zuletzt muß auch die aktuelle funktionelle Situation des einzelnen Hepatozyten für den Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase eine Rolle spielen, denn innerhalb vergleichbarer Zonen des Lobulus tritt nur ein definierter Prozentsatz der Parenchymzellen gleichzeitig in das S-Kompartiment ein (Tuczek u. Rabes 1973, Rabes 1978, 1979).

1.3.3. Zellproliferation und Tumorentstehung

Ein Tumor ist die Folge von Zellteilungen die keiner Kontrolle des Organismus mehr unterliegen, sondern autonom ablaufen. Sieht man die Ursache der Karzinomentstehung in einer somatischen Mutation, so muß dieser die Proliferation, d.h. die Festschreibung und Weitergabe des gesetzten Schadens folgen (Cayama et al 1978).

Viele Beispiele sprechen für eine wichtige Rolle der Proliferation bei der Tumorentstehung: so induziert eine einzige Dosis DMN bei erwachsenen Ratten nur Nierentumore, keine Lebertumore - bei jungen Ratten nach der Geburt aber Lebertumore. Ebenso erzeugt eine einzige DMN-Dosis bei erwachsenen Tieren Lebertumore, wenn sie mit partieller Hepatektomie verbunden ist (Craddock 1973).

Auffällig ist auch, daß die Rate an Nierentumoren nach 2/3 - Hepatektomie und nachfolgender DMN-Gabe viel größer ist als bei einmaliger DMN-Gabe ohne Teilhepatektomie. Allerdings könnte man hier einwenden, daß dann eben das Cancerogenangebot an die Niere größer ist (Rabes 1971, Rabes u. Meister 1973). Nimmt man während einer kontinuierlichen Cancerogenapplikation zusätzlich eine Teilhepatektomie vor, so wird die Latenzzeit bis zum Auftreten der Tumore verkürzt und die Tumore werden größer (Rabes 1970).

Die kritische Phase der Tumorentstehung ist gekennzeichnet durch eine massive endogene Zellproliferation (Fiala 1969) und einen gleichzeitigen Verlust der Fähigkeit auf extreme Proliferationsreize zu reagieren (Rabes 1970). Am 130. Tag einer kontinuierlichen DÄNA-Fütterung ist nach partieller Hepatektomie der Markierungsindex im Restparenchym nur unwesentlich höher als ohne vorangegangener Wachstumsstimulation (Rabes 1970). Ob dieses Verhalten der Hepatozyten aber ein spezifisch cancerogenbedingtes oder nur Folge einer unspezifischen Zellschädigung ist, bleibt zur Zeit noch unklar. Interessant wären Versuche mit bislang als cancerogen bekannten Stoffen und solchen, welche die Leber nur toxisch schädigen, sicher aber nach bisherigen Erkenntnissen nicht cancerogen wirken.

1.4. Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells

Die Leber der Ratte bietet auf Grund ihrer Aufteilung in fünf verschiedene Leberlappen die Möglichkeit, im Rahmen der experimentellen chemischen Cancerogenese innerhalb eines Organs Thesen über die Entstehung von Tumoren differenziert weiter zu verfolgen.

In der Rattenleber entstehen im Lobus sinister lateralis Enzymdefektbezirke mit höherer Rate als in anderen Leberlappen (Rabes u. Zettler 1974). Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob dieser besonders betroffene Leberlappen gegenüber den anderen eine allgemein erhöhte Grundproliferationsrate aufweist. Die Fragestellung wird dabei noch weiter unterteilt in basale Proliferation ohne Nitrosaminverabreichung und Proliferationsrate bei gleichzeitiger kontinuierlicher Nitrosaminfütterung für 23 Tage. Die Wachstumsfraktion wird bestimmt durch den Markierungsindex der Hepatozyten nach 9 Injektionen ^3H -Thymidin, verabfolgt in Intervallen von 6 Stunden an die Versuchs- und Kontrolltiere. Das Thymidin wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu entstehende DNA eingebaut. Um die gesamte Wachstumsfraktion zu ermitteln, wurde bei einer Zellzykluszeit der Hepatozyten von 48 Stunden der zeitliche Abstand der Injektionen auf 6 Stunden festgesetzt. So werden, bei einer $t_g = 7$ Stunden, Zweifachmarkierungen der selben Zellen weitgehend vermieden. Die Tiere wurden eine Stunde nach der letzten

Injektion getötet. Von den einzelnen Leberlappen wurden histologische Schnitte angefertigt und anschließend Autoradiographien hergestellt. Der Markierungsindex wurde getrennt nach periportal und perivenösen Bereichen mikroskopisch bestimmt, um so auch mögliche endogene Faktoren der Proliferation zu erfassen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Verwendete Versuchstiere, DÄNA-Fütterung

Verwendet wurden zwei Gruppen zu je sechs männlichen Ratten vom Stamm Wistar AF/Han. Die Tiere von Gruppe 1 erhielten Altromin-Standarddiät und Trinkwasser, dem DÄNA (Fr. Merck-Schuchardt/Darmstadt) zugesetzt war. Die tägliche Dosis betrug 5 mg DÄNA/kg KG und wurde über 23 Tage gegeben. Die Tiere hatten zu Beginn der DÄNA-Fütterung ein Gewicht von je 100g, zu Beginn der Markierung mit ^3H -Thymidin infolge unterschiedlicher Gewichtszunahme ein Gewicht von 150 - 170g. Die Kontrollgruppe, bestehend aus ebenfalls sechs männlichen Ratten, erhielt kein DÄNA. Das Gewicht dieser Tiere betrug zu Beginn der Markierung je 100g.

2.2. Markierung mit ^3H -Thymidin

Alle Ratten erhielten über einen Zeitraum von 48 Stunden in Intervallen von je 6 Stunden je eine intraperitoneale Injektion von ^3H -Thymidin, insgesamt 9 Injektionen. Begonnen wurde um 8⁰⁰ Uhr früh. Die spezifische Aktivität des Thymidins war 5 Ci/mM (Hersteller: Radiochemical Centre Amersham). Die Stammlösung mit 1 mCi/ml aqua dest. wurde vor der Injektion durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 4 verdünnt. Daraus ergab sich eine Aktivität von 200 $\mu\text{Ci/ml}$. Die Tiere erhiel-

ten pro Injektion $0,6 \mu\text{Ci/g KG}$.

2.3. Tötung der Tiere und Leberentnahme

Eine Stunde nach der letzten Injektion wurde den Tieren in Äthernarkose die Leber entnommen und in 10 %igem Formalin fixiert. Diesem war $0,4 \text{ mM}$ inaktives Thymidin zugesetzt, zum Austausch gegen überschüssiges, nicht in die DNA eingebautes markiertes Thymidin.

2.4. Anfertigung der histologischen Präparate und der Autoradiographien

Nach 2 - 5 Tagen wurden die Lebern in ihre fünf Lappen getrennt und in Paraffin eingebettet. Es wurden $3 \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, die nach der Entparaffinierung gewässert und 3×60 Minuten in inaktiver Thymidinlösung gewaschen wurden.

Für die Autoradiographien wurden die Präparate mit „Strippingfilm Kodak AR 10“ beschichtet, 7 bzw. 14 Tage lang bei 4°C exponiert, dann bei 27°C 7 Minuten mit Amidol entwickelt und abschließend mit Harris - Eosin gefärbt.

2.5. Auswertung der Autoradiographien

Die autoradiographische Technik ermöglicht es, Zellproliferation quantitativ zu messen. Das bei der Replikation

in die DNA eingebaute, radioaktiv markierte Thymidin führt zur Belichtung des Films über dem Zellkern. Nach Entwicklung sind an diesen Stellen kleine Silbergranula sichtbar. Es entsteht jedoch auch eine Background-Markierung, verursacht durch nicht in die DNA eingebautes markiertes Thymidin, sowie unspezifische geringe Schwärzungsintensität des Films. Um diese, bei der späteren Auswertung störende Schwärzung so gering wie möglich zu halten, wurden die Präparate vor der Anfertigung der Autoradiographien mehrmals in Lösungen mit inaktivem Thymidin gespült.

Als markiert wurde ein Hepatozyt dann gewertet, wenn über seiner Kernfläche mindestens das Dreifache der Zahl von Silbergranula lag, die über einer gleichgroßen extrazellulären Fläche gesehen wurde, wobei die Markierung genau der Geometrie des Kerns entsprechen mußte. Zur Auszählung wurden die 14 Tage lang inkubierten Präparate gewählt, da hier das Verhältnis von Zellmarkierung zu Background am günstigsten erschien.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10, Objektiv 40). Pro Präparat wurden mindestens 5000 Hepatozyten ausgezählt, zu gleichen Teilen periportal und perivenös. Hierfür wurden jeweils fünf periportale und fünf perivenöse Bereiche mit dem Rasterokular eingestellt und nach dem folgenden Schema jeweils neun Paster ausgezählt: in jedem Rasterquadrat wurden stets die Zellen mitgezählt, die

über dem linken und dem unteren Rand gefunden wurden,
um Doppelzählungen zu vermeiden.

3. ERGEBNISSE

Die einzelnen Tiere wurden nach folgendem Schema bezeichnet:

Tier Nr. 1 - 6 = mit DÄNA vorgefütterte Tiere

Tier Nr. 7 - 12 = Kontrollgruppe (ohne DÄNA-Fütterung)

a = Lobus sinister lateralis

b = Lobus medialis sinister et dexter

c = Lobus dexter lateralis

d = Processus caudatus

e = Processus papillaris

3.1. Markierungsindex der Hepatozyten in den einzelnen Leberlobi

Tabelle 1 zeigt den Markierungsindex der einzelnen Leberlappen für alle Tiere. Bereits in dieser Übersicht deutet sich an, daß der Markierungsindex des Lobus sinister lateralis offenbar nicht höher liegt als in den anderen Leberlappen. Das gilt für DÄNA-gefütterte Tiere wie für Kontrolltiere. Für alle weiteren Aufstellungen bleibt das Tier Nr. 12 unberücksichtigt, da hier auf Grund des in allen Lappen extrem niedrigen Markierungsindex ein versuchsbedingter Fehler zu vermuten ist. Es wäre möglich, daß die Injektion nicht exakt intraperitoneal erfolgte, so daß im Versuchszentrum eine unvollständige Resorption ablief.

Resten während OVA-Exposition
Tier-Nr.

Kontrolltiere ohne OVA-Exposition
Tier-Nr.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lobus												
Lob. sin. lat. (a)	4,5	3,7	4,6	4,3	4,1	3,4	4,1	6,0	3,1	4,3	4,9	1,0
Lob. med. (b)	4,5	4,7	5,0	6,4	4,7	3,3	3,3	6,0	6,5	5,3	5,0	2,0
Lob. dext. lat. (c)	3,8	3,0	3,6	6,3	7,4	3,8	4,3	5,0	2,9	5,3	4,3	0,6
Proc. caudatus (d)	3,6	3,2	4,6	5,5	7,6	4,9	4,5	5,5	3,0	4,8	3,0	0,6
Proc. papillaris (e)	4,0	3,2	5,6	2,9	5,0	3,4	4,6	4,7	3,1	4,3	4,4	1,3

Tabelle 1: Markierungsindex der fünf Leberlobi für die OVA-exponierten Tiere (Nr. 1 - 6) und die Kontrolltiere (Nr. 7 - 12): % der perivenös und periportal ³H-Thymidin-markierten Zellen, bezogen auf die ausgezählten Hepatozyten pro Lobus

3.2. Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der DÄNA-exponierten Tiere mit denen des Lobus dexter lateralis derselben Tiere

Die Gegenüberstellung mit dem Lobus dexter lateralis wurde gewählt, weil alle Untersuchungen des Lobus sinister lateralis, insbesondere das vermehrte Auftreten der EDB, im Vergleich mit dem Lobus dexter lateralis erfolgten.

Die Gegenüberstellung erfolgt getrennt nach periportal und perivenösen Arealen. Wie in Punkt 1.3.2. bereits beschrieben, ist die Zellproliferation in den periportal Lappchenbereichen allgemein höher als in den Zonen um die Zentralvene. Für normalverteilte Kollektive gilt: zwei Mittelwerte ($\bar{x}$) sind dann signifikant verschieden, wenn ihre Differenz größer ist, als die doppelte Summe ihrer Standardabweichungen ($\bar{s}$).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_1)^2 + (\bar{x} - x_2)^2 + \dots + (\bar{x} - x_n)^2}{n - 1}}$$

Soweit überhaupt signifikante Unterschiede bestehen - dies ist lediglich in 10 von 144 möglichen Vergleichen der Fall - ist der Markierungsindex des Lobus dexter lateralis höher als der des Lobus sinister lateralis. Dabei fällt auf, daß es sich ausschließlich um die Vergleiche mit dem Markierungsindex des Lobus dexter lateralis des Tieres Nr. 5 handelt.

Eine Tendenz hinsichtlich eines Überwiegens der Proliferation perivenös bzw. periportal ist aus diesen wenigen signifikanten Unterschieden nicht zu erkennen.

Um eventuell doch bestehende signifikante Unterschiede, die nach obiger Methode durch aus der Reihe fallende Einzelwerte verschleiert werden könnten, zu erkennen, wurde noch der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Dieser Rangtest hat seine Bedeutung insbesondere für nicht normalverteilte Stichproben.

Aufstellung der Rangzahlen:

Stichprobenwert	x_1	x_2	x_3	x_4		x_n
Stichprobe	B	A	B	B		A
Rangzahl	1	2	3	4		i

Berechnung der Prüfgrößen U_1 und U_2 :

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1 \quad ; \quad U_2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_2$$

wobei m, n = Summe der Stichprobenwerte

R_1, R_2 = Summe der auf Stichprobe 1 bzw. 2 entfallenden Rangzahl

Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden Größen U_1 und U_2 . Mit dieser Prüfgröße U sucht man in den verschiedenen Signifikanzniveau-Tabellen den zu dem jeweiligen m und n gehörenden kritischen Wert auf. Ist $U \leq$ diesem gefundenen Wert, so besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden unabhängigen Stichprobengruppen. Es wurden folgende Signifikanzniveaus ($=\alpha$) für den zweisei-

tigen Test verworfen:

$\alpha = 0,2$ ($\hat{=}$ einer 80%-igen Aussagewahrscheinlichkeit)

0,1

0,05

0,02

0,01

0,002 ($\hat{=}$ einer 98%-igen Aussagewahrscheinlichkeit)

Auch nach diesen genannten Kriterien ergeben sich für die Markierungsindices zwischen Lobus sinister lateralis und Lobus dexter lateralis der DÄNA-gefütterten Tiere keine signifikanten Unterschiede.

3.3. Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der Kontrolltiere mit denen des Lobus dexter lateralis derselben Tiere

Die Gegenüberstellung erfolgte wiederum getrennt nach periportalen und perivenösen Zonen. In 3 von 144 möglichen Vergleichen ist der Markierungsindex des Lobus dexter lateralis signifikant höher als der des Lobus sinister lateralis. Dies betrifft ausschließlich den Markierungsindex der periportalen Zone des Tieres Nr. 10. Nach dem U-Test ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.4. Vergleich der Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der DÄNA-exponierten Tiere mit dem der nicht vorbehandelten Kontrolltiere

Die Gegenüberstellung erfolgt ebenfalls getrennt nach peri-

portalen und perivenösen Zonen. Mit Ausnahme eines von 144 Vergleichen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Markierungsindices des Lobus sinister lateralis der DÄNA-exponierten und dem der Kontrolltiere.

Auch für diesen Vergleich wurde der U-Test angefertigt. Danach ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Markierungsindex des Lobus sinister lateralis der DÄNA-Tiere und dem der Kontrolltiere.

4. DISKUSSION

4.1. Zur Methode der ^3H -Thymidin-Markierung

Die Dauer der S-Phase der Hepatozyten (t'_S) beträgt ca. 8 Stunden (Rabes et. al. 1976). Die Markierung erfolgte alle 6 Stunden, denn ist das Markierungsintervall kürzer als t'_S , werden alle Zellen markiert, die zwischen der ersten und der letzten ^3H -Thymidin-Markierung in die DNS-Synthesephase eingetreten sind. Der gesamte Markierungszeitraum betrug für DNS-synthetisierende Hepatozyten damit 48 Stunden. Bei der regenerierenden Rattenleber beträgt t'_S 33 Stunden (Rabes 1972), in der ruhenden Leber ein Vielfaches dieses Wertes. Eine männliche Ratte des Stammes Wistar AF/Han gilt mit etwa 300 g KG als ausgewachsen, die Zellproliferation ist dann nur noch eine steady-state-Regeneration. Die DÄNA-Tiere mit einem Gewicht von 150 - 170 g und vor allem die Kontrolltiere mit einem Gewicht von 100 g sind junge adoleszente bzw. jugendliche Tiere und weisen somit noch eine erhöhte Grundproliferation auch im Lebergewebe auf. Die Zellzykluszeit (t_C) ist somit für die Kontrolltiere mit einer Dauer von 33 Stunden anzunehmen, für die DÄNA-vorbehandelten Tiere ist sie mit großer Wahrscheinlichkeit länger. Genaue Zahlen lassen sich hier in der Literatur nicht finden, so daß die Wachstumsfraktion nur mit einem erheblichen Unsicherheitsfaktor bestimmt werden kann. In Erwägung zu ziehen wäre eine Wiederholung

des Versuchs mit Kontrolltieren, deren Gewicht annähernd dem der DÄNA-behandelten Tiere nach Beendigung der DÄNA-Fütterung entspricht.

4.2. Zur Bestimmung der Markierungsindices

Pro Leberlappen wurden zwischen 5000 - 8000 Zellen ausgezählt. Die auszuzählenden Bereiche wurden streng nur nach periportal oder zentrolobulärer Zuordnung randomisiert ausgewählt, unabhängig von auf den ersten Blick eventuell sichtbarer starker oder schwacher Markierung. Bei dieser Anzahl an ausgewerteten Hepatozyten müßten Differenzen in der Proliferationsrate mit Hilfe der Bestimmung der GF erfaßt werden, selbst wenn es sich bei den ausgewerteten Zellen nur um einen kleinen Ausschnitt aus dem Leberlappen handelt.

Signifikante Unterschiede sind - abgesehen von ganz wenigen Einzelvergleichen - nicht vorhanden. Diese Einzelfälle zeigen darüber hinaus eher eine leichte Tendenz in Richtung vermindelter Proliferationsrate des Lobus sinister lateralis. Es bliebe vielleicht noch die Möglichkeit, mehr Zellen auszuzählen. Aber bereits die vorliegenden Zahlen zeigen, daß auch in den Lappen, in denen zufälligerweise mehr Zellen ausgezählt wurden, sich nicht vermehrt signifikante Unterschiede in den Markierungsindices im Vergleich zu den Lobuli zeigen, in denen weniger Zellen ausgewertet wurden. Folgendes Beispiel soll das zeigen:

Tier Nr. 1 / Processus caudatus

pro Raster ausgezählte Hepatozyten	Markierungsindex
1030	2,6
1046	3,4
848	5,5
443	4,4

Zu Überlegen bliebe noch die Möglichkeit, einen Regenerationsstimulus zu setzen, um eventuell doch bestehende diskrete Unterschiede durch insgesamt höhere Markierungsindizes aufzudecken. Die partielle Hepatektomie ist bei lappendifferenzierenden Untersuchungen keine Möglichkeit. Zu denken wäre an eine Phenobarbitalgabe. Diese lebertoxisch wirkende Substanz induziert in der Leber mischfunktionelle Oxydasen (Renner 1970), führt zu Zellhypertrophie und Hyperplasie (Rabes 1978). Die proliferationssteigernde Wirkung ist allerdings nur gering (Tuczek et. al. 1975, Rabes 1979).

Eine noch einfachere Methode wäre die Verwendung ganz junger Tiere. Es bleibt allerdings zu bezweifeln, ob eventuell dadurch zutage tretende diskrete Unterschiede in der Zellproliferation noch in ursächlichem Zusammenhang gesehen werden könnten mit dem vermehrten Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis.

4.3. Überlegungen zum vermehrten Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis

Es steht außer Zweifel, daß die Zellproliferation eine mitentscheidende Rolle in der Cancerogenese spielt. Die Fixierung promutagener Läsionen ist an die Zellproliferation ebenso gebunden wie später die Expression der Neoplasie in der präneoplastischen Latenzperiode (Rabes 1979). Die Überwiegende Zahl maligner Tumore entsteht im Tierexperiment wie auch beim Menschen in Geweben mit kontinuierlicher Zellerneuerung (Warwick 1971, Rajewsky 1972, Craddock 1976, Rabes 1979). Kein Karzinom könnte z.B. in der Leber, einem Gewebe mit unter Ruhebedingungen minimaler Zellregeneration, entstehen ohne erhöhte, die Zellschädigung fixierender und weitergebende Zellproliferation. So steigt bei Ratten, die einige Tage nach einer Lebercancerogendosis eine zweite, geringere, allein nicht tumorinduzierende Dosis erhalten und zusätzlich partiell hepatektomiert werden, die Hepatomrate im Vergleich zu nicht hepatektomierten Tieren deutlich an (Farber 1978, Rabes 1979).

Die gedankliche Grundüberlegung dieses Teils der Arbeit war es, ob für das vermehrte Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis eine ohnehin, auch unter Normalbedingungen bestehende erhöhte Proliferationsaktivität vorliegt. Das muß nach den erzielten Ergebnissen für mit Cancerogen gefütterte wie für nicht behandelte Tiere verneint werden. Man weiß zwar, daß die Proliferationsaktivität in einmal

entstandenen EDB um ein Vielfaches über der des normalen Parenchyms liegt (Rabes 1978, 1979). Das ist aber erst der zweite Schritt, der die vermehrte Entstehung der EDB nicht erklären kann, sondern zur Voraussetzung hat. Es müssen andere Ursachen vorliegen.

Zu denken ist an eine verstärkte Durchblutung dieses Leberlappens, die zu einem Mehrangebot des Cancerogens führt. Wie bereits früher erwähnt, liegen zur lappendifferenzierten Leberdurchblutung keine Untersuchungen vor. Zu untersuchen wäre ferner, ob der Lobus sinister lateralis vermehrt Blut aus den intestinalen Ästen der Vena portae erhält, die ja - im Gegensatz zu den lienalen Ästen - bei oraler Cancerogenapplikation diese Substanz der Leber primär zuführen. Das bleiben im Augenblick jedoch nur hypothetische Überlegungen. Bedeutsam wäre die Tatsache eines vermehrten Cancerogenangebots, wenn man von folgender Überlegung ausgeht: viele mutagen wirkende chemische Cancerogene sind dosisabhängig zytotoxisch (Carver et. al. 1979). Dieser toxisch bedingten Zellschädigung folgt eine Phase der kompensatorischen Hyperplasie (Stewart u. Magee 1971, Hard 1975, Deschner 1978). Dadurch werden ruhende Zellen in das proliferative Compartment überführt, wo sie für die transformierende Wirkung eines Cancerogens besonders anfällig sind (Rabes 1979). Unterstellt man nun, daß der Lobus sinister lateralis stärker durchblutet wird bzw. anteilsweise mehr Blut aus den intestinalen Ästen der Vena portae bekommt, so würde er im Vergleich zu den anderen Leber-

lappen vermehrt von zytotoxischen Cancerogendosen getroffen. Dies würde nach obigen Ausführungen einen Proliferationsreiz bedeuten, der die Zellen in diesem Leberlappen dann anfälliger macht für die transformierende Wirkung nachfolgender Cancerogendosen. Daß die Zellproliferation ferner generell abhängig ist von der Durchblutung zeigt die Tatsache, daß sie bei allen Versuchen - auch die vorliegenden zeigen es - läppchenperipher höher ist als zentrolobulär, d.h. mit sinkendem O_2 -Gradienten vom afferenten zum venösen Pol abnimmt (Rabes 1976). Auch die t_{G1} , die variabelste Phase des Zellzyklus, ist unterschiedlich lang je nach Abstand der Zellen von den afferenten Blutgefäßen (Rabes 1976). Wenn also eine Mehrdurchblutung des Lobus sinister lateralis tatsächlich vorläge, müßte (analog dem Gesagten) die Grundproliferation dieses Lappens höher sein als die der anderen Lobi. Das ist aber nicht der Fall.

Es müssen also andere, möglicherweise biochemische Mechanismen eine ursächliche Rolle spielen für das vermehrte Auftreten der präneoplastischen EDB im Lobus sinister lateralis. In diesem Zusammenhang ist die cancerogene Wirkung der Nitrosamine über den Weg der Basenalkylierung zu analysieren, insbesondere ob das Auftreten des Alkylierungsproduktes O^6 -Alkyl-Guanin, dem große Bedeutung als promutagene DNA-Basenläsion angemessen wird, in den einzelnen Leberlappen quantitative Unterschiede aufweist. Dies ist die Aufgabe des zweiten Teils der Arbeit.

Teil II : Biochemische Untersuchungen zur Bedeutung der
DNA-Alkylierung für die Lebertumorinduktion
durch Dimethylnitrosamin (DMN)

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Nitrosamine

1.1.1. Dosis - Wirkungs - Beziehung

Die Nitrosamine weisen eine exakte Dosis-Wirkungs-Beziehung auf und eine lineare Regression über der applizierten Gesamtdosis wie über der Induktionszeit (Druckrey 1961). Ferner weist, bei Anwendung auf immer denselben Tierstamm, die lineare Regression vieler untersuchter Nitroso-Verbindungen stets dieselbe Neigung bezüglich verschiedener Wirkungen (therapeutischen - toxischen - letalen Dosierungen) innerhalb einer Wirkungsweise auf. Folglich kann von einem einheitlichen, dosisunabhängigen Wirkungsmechanismus ausgegangen werden. Zwischen der Höhe der Tagesdosis und der Zeit bis zum Auftreten von Tumoren besteht die Beziehung $d \times t^n = \text{const.}$, wobei n eine für jedes Cancerogen charakteristische Größe ist (Rajewsky 1966). Somit ist die cancerogene Wirkung die Summierung irreversibler Primäreffekte, verursacht durch die jeweilige Einzeldosis. Dabei ist noch hinzuzufügen, daß absolut gesehen die zur Krebsерzeugung erforderliche Gesamtdosis

mit zunehmender Zahl der C-Atome eines Dialkylnitrosamins steigt. Sie beträgt beispielsweise für DMN 500 und für DÄNA 700 mg/kg KG (Druckrey 1961).

1.1.2. Metabolismus der Nitrosamine

Durch Beobachtungen nach subcutaner Injektion wurde festgestellt, daß die Nitrosamine keine direkte Wirkung am Ort der höchsten Konzentration, der Applikationsstelle ausüben. Dies legt den Schluß nahe, daß es sich bei den verabfolgten Substanzen nicht um die direkte Wirkform handelt, sondern um eine indirekte "Transportform", die erst im Stoffwechsel zu ihrer eigentlichen cancerogenen Wirkform, dem ultimalen Cancerogen (Miller 1978) metabolisiert wird (Craddock u. Magee 1963, 1966, Druckrey 1967, Margison 1979).

Die Nitrosamine werden schnell und gleichmäßig im ganzen Körper verteilt (Magee 1956). Die Tatsache, daß bestimmte Cancerogene aber nur in bestimmten Organen Tumore erzeugen, legt die Vermutung nahe, daß zur Giftung der Stoffe ein Metabolismus notwendig sein muß, über den jeweils nur diese bestimmten Organe verfügen. Denn wäre der einzige Ort der Giftung vom Procancerogen zum Cancerogen die Leber, so müßten in jedem Fall stets in der Leber, dem Ort der größten Konzentration, Tumore entstehen. Das ist jedoch nicht der Fall. Es ist vielmehr davon auszugehen, daß auch die Metabolisierung der cancerogenen Stoffe nur ein Schritt, wenn auch ein bedeutender, auf

dem Weg zur Tumorentstehung ist.

Hinter der Organspezifität der Nitrosamine werden spezifische Enzyme vermutet. Die Organverteilung der Tumore repräsentiert sehr wahrscheinlich die Verteilung der hierfür notwendigen Voraussetzungen (Druckrey 1967, Pegg 1977). Nach Emmelot und Benedetti (1960) soll es sich bei dem verantwortlichen Enzym um eine mischfunktionelle Oxydase, nämlich eine mikrosomale N-Dealkylase handeln. Dieses Enzym kommt in höchster Konzentration in der Leber vor (Knecht 1966), aber auch in Niere und Lunge; Organe, in denen ebenfalls Tumore entstehen. Magee (1974) und Druckrey und Schmähel (1962) sehen in dem gleichfalls in der Leber vorkommenden α -Hydroxylasen das aktivierende Enzymsystem. Durch enzymatische Hydroxylierung geht das Dialkylnitrosamin über in α -Hydroxyalkylnitrosamin, dieses wird dealkyliert und über die instabile Zwischenstufe des Alkyl-Diazonium-Ions entsteht das Carbonium-Ion, welches die DNA-Basen, und daneben auch andere zelluläre Moleküle alkyliert (siehe 1.2.3.). Für die Bedeutung dieser α -Hydroxylasen spricht der Ames-Test: inkubiert man eine Bakterienkultur, die nicht über Hydroxylasen verfügt, mit DÄNA, so entstehen keine Mutationen. Wiederholt man den Versuch unter Hinzugabe einer mikrosomalen Fraktion von Leberzellen, so sind Mutationen zu beobachten. Ebenfalls mutagen auf Bakterien wirkt Methylnitroso-N-Guanidin, welches in der Lage ist, spontan Alkyldiazoniumverbindungen zu bilden.

Neben der organunterschiedlichen Giftung des Procancerogens zum ultimalen Cancerogen bestehen Unterschiede nach Spezies (Meerschweinchen verfügen z.B. nicht über das Enzymsystem N-Hydroxylase bzw. Sulfotransferase und bilden keine Tumore), Geschlecht (männliche Tiere zeigen höhere Aktivität dieses Enzyms und entwickeln auch mehr Tumore) und Alter. Auch exogene Faktoren können die Tumorentstehung beeinflussen: so führt z.B. eine der DMN-Applikation folgende Phenobarbitalgabe zur Verkürzung der Latenzzeit der Tumorentstehung (Rabes 1976, 1978). Phenobarbital ist offenbar ein organspezifischer Promotor der Cancerogenese in der Leber. Nicht zuletzt spielt auch die Ernährung eine Rolle: proteinarme Kost kann die Organotropie der Tumorentstehung bei der Ratte durch DMN verändern, es entstehen z.B. mehr Nierentumore nach einmaliger Injektion von DMN.

1.1.3. Basenalkylierung, Bedeutung der einzelnen Alkylierungsprodukte, insbesondere O⁶-Alkyl-Guanin

Die Irreversibilität der hervorgerufenen präneoplastischen Veränderungen weist auf eine entscheidende Rolle der Nucleinsäuren, insbesondere der DNA, dem Träger der Erbinformation, hin. Einen entscheidenden Vorgang im Rahmen dieses Geschehens stellt die Alkylierung der Purinbasen dar: das über das Methyldiazonium entstandene Carbonium-Ion reagiert als elektrophiles Reagenz mit nukleophilen Zentren der Nucleinsäurebasen (Craddock u.

Magee 1966, Rabes 1979). Untersucht man die nach Alkylierung mit DMN oder DÄNA in der Rattenleber entstandenen Nucleinsäuren, so findet man als Hauptalkylierungsprodukt stets 7-Alkyl-Guanin (Lawley u. Thatcher 1970, Craddock 1973, Singer 1975, Pegg 1977, Rabes 1979). Dies läßt sich durch die günstige Position des Guanins in der Tertiärstruktur der Doppelhelix und die große Elektronenverfügbarkeit am N⁷-Atom erklären. In weitaus geringerem Maße finden sich 3-Alkyl-Adenin, O⁶-Alkyl-Guanin, 1-Alkyl-Adenin und 3-Alkyl-Adenin. Dabei alkylieren methylierende Reagentien allgemein mehr als äthylierende (Singer 1975, Pegg 1977). Ferner zeigt sich eine unterschiedliche Organaffinität der Methyl- (→ Leber), Äthyl- (→ Niere) und Butyl- (→ Blase) Substituenten (Pegg 1977).

Eine entscheidende Bedeutung bei der Alkylierung kommt den Stellen in der DNA zu, die maßgeblich sind für die spezifische Basenpaarung und damit auch für mögliche Fehlpaarungen, d.h. somatische Mutationen. Dies könnten innerhalb der DNA Positionen sein, die an Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix teilnehmen (Craddock 1973) und in verändertem Umfang in einzelsträngiger DNA alkyliert werden, wenn der Doppelstrang aufgehoben wird (Singer 1975), wie dies bei der Transskription geschieht.

Zunächst vermutete man im 7-Alkyl-Guanin das für die Carcinogenese entscheidende Alkylierungsprodukt (Lawley u. Brooks 1961), da es stets am meisten gebildet wird. Bald

jedoch wurde entdeckt, daß zwischen der Menge an entstandenem 7-Alkyl-Guanin und der Induktion von Tumoren keine quantitative Korrelation besteht (Swann u. Magee 1968, Craddock 1973, Singer 1975, Pegg 1977). Bei der Methylierung mit Methyl-Methansulphonat beispielsweise, welches in der Leber keine Tumore erzeugt, entsteht mehr 7-Methyl-Guanin als bei der Methylierung mit DMN. Bei in vitro-Versuchen wurde nachgewiesen, daß 7-Alkyl-Guanin nicht zum Einbau von falschen Nukleotiden in die DNA führt.

Als erster wies der Bakteriologe Loveless (1969) auf die mögliche Bedeutung des O⁶-Alkyl-Guanins für Mutagenese und Cancerogenese hin. Bei der Bestimmung der Alkylierungsprodukte verschiedener Cancerogene korreliert die Entstehung von Tumoren viel besser mit der Fähigkeit O⁶-Alkyl-Guanin zu bilden als 7-Alkyl-Guanin oder irgendein anderes Alkylierungsprodukt (Lawley u. Thatcher 1970, Swann u. Magee 1968, Craddock 1973, Kleihues u. Margison 1976). Die Alkylierung des Guanins am O⁶-Atom fixiert die Base in einer unnatürlichen tautomeren Form, was zu Fehlpaarungen führen könnte.

Lawley (1970, 1972) fand ferner, daß bei Exposition mit weniger potenten Cancerogenen weniger O⁶-Alkyl-Guanin entsteht. Inkorporiert man O⁶-Methyl-Guanin in Polynukleotide, so führt es zu Fehlpaarungen bei in vitro-Versuchen (Singer 1975, Pegg 1977). Auf der anderen Seite hat aber

nicht jede cancerogene Nitrosoverbindung die Bildung von O^6 -Alkyl-Guanin zur Folge (Lawley u. Thatcher 1970). Versuche haben auch gezeigt, daß in Geweben, in denen kein Tumor entsteht, die O^6 -Alkyl-Guaninkonzentration höher sein kann als in den Geweben mit Tumorentstehung (Rogers u. Pegg 1977, Margison 1977, Cooper et. al. 1978, O'Connor 1981). Die Menge an entstandenem O^6 -Alkyl-Guanin ist nicht der alleinverantwortliche Parameter der Cancerogenese.

1.1.4. Persistenz des O^6 -Alkyl-Guanins

Bei einer Dosis von 2 mg DMN/kg KG wird für O^6 -MeGua in der Rattenleber eine Halbwertszeit von 13 Stunden angenommen (Pegg 1977). Untersuchungen von Swann und Magee (1968), Rajewsky (1974, 1976) und Margison und Kleinhues (1975) geben Hinweis darauf, daß die Frage der Persistenz von O^6 -Alkyl-Guanin bedeutsam ist für die Entstehung von Tumoren. Bei Alkylierung mit NEU und NMU entstehen mit hoher Spezifität Tumore im Gehirn und Nervensystem, nicht aber z.B. in der Leber (Druckrey 1967). Dennoch werden auch in anderen Organen gleich hohe Konzentrationen an Alkylierungsprodukten gemessen wie im Gehirn. Man stellte aber fest, daß es unterschiedliche Eliminationsgeschwindigkeiten gab. Für 3-Alkyl-

Adenin und 7-Alkyl-Guanin war sie in jedem Organ gleich, für O^6 -Alkyl-Guanin dagegen z.B. in der Leber schneller als im Gehirn (Goth u. Rajewsky 1974). Ähnliche Beobachtungen gibt es für MNU (Margison 1975). In dieselbe Richtung weist die Tatsache, daß in der Niere, in der im Gegensatz zur Leber auch nach hohen Einzeldosen Tumore entstehen können, die Elimination von O^6 -Alkyl-Guanin langsamer vonstatten geht als in der Leber (Nicoll et.al. 1977). Dabei ist das Ausmaß der Elimination von O^6 -Alkyl-Guanin vor der DNA-Replikation von entscheidender Bedeutung (Pegg 1977). Besondere Bedeutung könnte die verlängerte Persistenz für Organe haben, die geringere Proliferationstätigkeit haben.

1.1.5. Bedeutung von Reparaturmechanismen und deren Irrtumsanfälligkeit für die Cancerogenese

Zweifel an einem direkten Kausalzusammenhang zwischen der Menge an O^6 -Alkyl-Guanin und der Tumorentstehung werfen Beobachtungen auf, wonach O^6 -Alkyl-Guanin in vivo rasch aus der DNA eliminiert wird. Bei der Alkylierung mit verschiedenen Nitrosamin-Dosierungen ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen der Nitrosamin-Dosis und dem Maß an entstandenem 7-Alkyl-Guanin, nicht jedoch bei O^6 -Alkyl-Guanin, welches in der Leber-DNA in geringerem Ausmaß als erwartet nachweisbar ist. Diese Ergebnisse lassen eine enzymatische Beseitigung des O^6 -Alkyl-Guanins vermuten (Pegg 1977, 1978; Strauss et.al. 1978, Rabes 1979).

Die Mechanismen zur Reparatur von Schäden der DNA sind wesentlich für die Erhaltung der genetischen Kontinuität. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Fehlen von Enzymen zur Beseitigung von DNA-Photoprodukten bei Xeroderma pigmentosum; dieser Defekt ist mit der Entstehung von Hauttumoren korreliert.

Die Kenntnisse auf dem Gebiet der DNA-Reparatur stammen hauptsächlich aus Versuchen mit Bakterien, insbesondere *E.coli*, und nur in geringerem Ausmaß von Säugetierzellen.

Nach Hanawalt et.al. (1979) beginnt die Excisionsreparatur mit der Erkennung der DNA-Schädigung durch ein Protein. Dies ist offenbar der entscheidende, den ganzen Vorgang limitierende Faktor. Damit wird eine bestimmte Reihenfolge biochemischer Reaktionen in Gang gesetzt. Es wird durch eine Endonuklease ein Phosphordiester-Strang=schnitt gemacht, die Läsion wird durch Exonukleasen aus dem Strang herausgeschnitten, das fehlende Stück am komplementären DNA-Strang unter Mitwirkung einer Polymerase rekonstruiert und durch eine Ligase wieder eingefügt.

Lindahl (1979) diskutiert hierzu zwei unterschiedliche Wege; die Nucleotid-Excisionsreparatur und die Basen-Excisionsreparatur.

Die Nucleotid-Excisionsreparatur wurde entdeckt bei Studien über die Beseitigung von durch UV-Bestrahlung entstandenen Thymidin-Dimeren aus der DNA. Endonucleasen, die den DNA-Strang spalten, sind in Bakterien gefunden

worden. Von E.coli weiß man, daß die Genprodukte von uvrA, uvrB und uvrC zu dieser Reparatur benötigt werden. Dieser komplizierte Mechanismus läßt vermuten, daß die Enzyme an der Beseitigung vieler verschiedener DNA-Läsionen von ganz unterschiedlicher Struktur beteiligt sind. Je komplizierter aber ein Vorgang, umso fehleranfälliger ist er. Eine mögliche Fehlerursache könnte z.B. auch die Schließung der durch die Endonuclease katalysierten Strangbrüche durch die DNA-Ligase sein, noch bevor das Pyrimidin-Dimer durch die Exonuclease exzidiert ist. Es muß mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Mechanismus existieren, der eine vorzeitige Ligase-Aktivität verhindert. Auch für die Polymerase wird ein Korrekturfaktor, der prüft, ob mit der richtigen Sequenz repariert wurde, diskutiert. Man spricht von einer sogenannten "proof-reading-exonuclease".

Das Modell der Basen-Excisions-Reparatur nach Lindahl geht davon aus, daß der initiale enzymatische Schritt die Entlassung eines alterierten Basenrestes aus der DNA durch eine DNA-Glykosylase ist. Solche Glykosylasen wurden bereits für Uracil und 3-MeAd in Bakteriensystemen genau beschrieben und auch in Säugetierzellen nachgewiesen (Lindahl 1979). Für 3-MeAd gibt es auch Hinweise bei Nagetieren (Margison 1979). Anzeichen für ein O^6 -MeGua-Reparaturenzym gibt es bereits in vielen Versuchen (Margison 1979), so auch in zellfreien Extrakten aus Rattenleber und -niere (Pegg 1978). Es ist jedoch bis

Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Methyltransferase, die die Methylgruppe des O^6 -MeGua auf den Cysteinrest eines Proteins überträgt (Olsson u. Lindahl 1980).

Beim Excisionsprozess resultierende A-Purin- bzw. A-Pyrimidin-Stellen sind Angriffspunkt spezifischer AP-Endonucleasen. Der weitere Ablauf ist derselbe wie bei der Nucleotid-Excisionsreparatur. Dieser Weg, der einen Schritt mehr beinhaltet, scheint im Vergleich zur Nucleotid-Excisionsreparatur der einfachere, dafür aber weniger vielseitige Modus zu sein; denn die bis jetzt gefundenen Glykosylasen sind kleine, monomere Proteine von hoher Spezifität für einen bestimmten Typ der DNA-Schädigung. Dieser Weg scheint somit beschränkt zu sein auf eine kleine Zahl von häufig vorkommenden Läsionen (Lindahl 1979).

Die Excisions-Reparatur ist nach Hanawalt et. al. allerdings nur in Doppelstrangregionen der DNA möglich, nicht an Einzelsträngen wie z.B. im Bereich der sich zur Replikation auftrennenden DNA. Hier fehlt dann der komplementäre Strang zur Rekonstruktion des fehlenden Abschnittes. Nach Hanawalt et. al. gibt es hier zwei hypothetische Möglichkeiten. Die Replikation könnte vollständig gestoppt werden und nach der Läsion wieder neu beginnen. Oder die Replikation läuft durch die Läsion und erhält sie damit. Welcher Weg eingeschlagen wird, könnte von dem Schweregrad der Läsion abhängen. Einige Schäden interferieren mit der Replikation vielleicht überhaupt nicht, wohinge-

gen bei anderen die Replikation möglicherweise vollständig stoppt und Mutationen entsprechend unter in Kaufnahme des Zelltods verhindert werden. Unabhängig von der Wahl des richtigen Weges ist es sehr leicht vorstellbar, daß jede Replikation, die eine DNA-Läsion passiert, irrtumsanfällig ist.

Für die Fälle, in denen die Replikation der DNA vor der Läsion gestoppt und dahinter wieder neu aufgenommen wird, wird ein sogenannter "post-replication-repair" diskutiert. Die nicht replizierbare Defektstelle wird durch einen Rekombinationsmechanismus zwischen Mutter- und Tochterstrang geschlossen: aus dem Mutterstrang wird ein entsprechendes Ersatzstück in den Tochterstrang eingebaut, der fehlende DNA-Abschnitt im Mutterstrang später wieder mittels Polymerase und unter Verwendung des Tochterstranges als Matrize geschlossen. Dieser Weg gilt als wenig irrtumsanfällig, solange nicht viele Primärläsionen aufeinander folgen.

Ein weiterer, bisher aber nur bei Bakterien nachgewiesener Mechanismus ist die SOS-Reparatur. Dieser stark mutagene Reparaturmechanismus gilt nur für Notfälle, in denen schwere DNA-Läsionen zu Fehlreplikationen bzw. zu einem Replikationsstopp (=Zelltod) führen würden. Er basiert auf der Aktivierung von Enzymen, die Fehler ignorieren und der Hemmung von Enzymen, die Fehler erkennen. Damit dürfte dieser Weg weniger für Wechselgewebe als für wenig bzw. gar nicht regenerierungsfähige Gewebe Bedeutung haben.

Bei all den genannten Mechanismen unterscheidet man eine "short-patch-repair" und eine "long-patch-repair". Die erstere betrifft die Excision nur weniger Nucleotide (10 - 30) und gilt als wenig irrtumsanfällig; wohingegen letztere wesentlich mehr Nucleotiden umfassen kann und in höherem Maße irrtumsanfällig ist.

Von Adaptionsreparatur spricht man, wenn Schäden, die zum wiederholten Mal auftreten, schneller und quantitativ besser repariert werden. Eine kontinuierliche DMN-Exposition vergrößert die Kapazität der O^6 -Alkyl-Guanin-Reparatur in der Leber, es werden vermehrt Glykosylasen gebildet (Montesano 1980). Dies wurde auch für Wistar-Ratten nachgewiesen (Margison 1979). Dieser Reparaturmechanismus ist irrtumsfrei, wenn das Cancerogen in kontinuierlichen kleinen Dosen gegeben wird (Robins und Cairns 1979). Er ist jedoch erschöpfbar mit steigender Cancerogendosis. So ist bei einer Dosis von 9 mg DMN/kg die O^6 -MeGua-Reparatur die ersten 20 Stunden nahezu vollständig verhindert (Pegg 1977). Hierfür spricht das mit zunehmender Dosis ansteigende Verhältnis O^6 : 7-Alkyl-Guanin.

Dieses Verhältnis ist auch in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedlich. In der G_0 - und G_1 -Phase ist es größer als in der S-Phase, wobei die N 7-Fraktion im Verhältnis zum Gesamtguanin stets in derselben Größenordnung bleibt (Rabes 1979). Das Absinken des Quotienten wird folglich durch eine Verminderung des O^6 -Alkyl-

Guanin hervorgerufen. Gerade in der S-Phase aber besitzen die Nitrosamine eine selektive Cancerogenität, sie ist die vulnerable Phase des Zellzyklus (Craddock 1973, Rabes 1979).

Nach Rabes (1979) könnte ein mögliches Bindeglied zwischen niedrigem O^6/N^7 -Verhältnis in der S-Phase einerseits und selektiver Cancerogenität der Nitrosamine in dieser Zellzyklusphase andererseits, ein schneller, irrtumsanfälliger Reparaturmechanismus sein. Die Irrtumsanfälligkeit der Reparaturvorgänge ist in der S-Phase wahrscheinlich am größten, da sich die Reparatur an sich teilenden DNA-Strängen sehr schnell vollziehen muß. Die Zelle ist in dieser Zyklusphase bereits im Normalfall mit komplizierten Vorgängen, wie Transskription und Translation befaßt. Wird sie zudem von einer hohen Cancerogendosis getroffen, steigt mit der Anzahl der Läsionen die Häufigkeit fehlerhafter Reparaturen. Ferner unterliegen auch die Korrekturgene durch Alkylierung einer Funktionsbeeinträchtigung. Da fehlerhaft durchgeführte Reparaturen ebenso mutagen sein können wie die primäre Läsion, kommt der Menge an entstandenem O^6 -Alkyl-Guanin für die Cancerogenese schon Bedeutung zu.

Gegen eine Alleinverantwortlichkeit des O^6 -Alkyl-Guanins spricht ferner: bei gesunden Ratten führt eine einmalige DMN-Applikation nicht zu Lebertumoren. Anders hingegen bei vorher partiell hepatektomierten Tieren, bei denen auch einmalige DMN-Exposition zu Leberkarzinomen führt.

Die Zellreplikation dürfte ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung sein (Craddock 1973, Rabes 1979, Ying 1979). DMN führt in einer Dosierung von 30 mg/kg zur perivenösen Nekrose im Leberlobulus (Barnes u. Magee 1954). Dieser Zellverlust wird durch kompensatorische Hyperplasie des Rsetparenchyms ausgeglichen (Altmann 1966). Toxische Dosen des Cancerogens stellen somit einen Proliferationsreiz für das intakt gebliebene Gewebe dar. Da andere Zellen aber gleichzeitig "nur" einer cancerogenen, nicht toxischen Dosis getroffen werden, können sich beide Effekte, Proliferation und Alkylierung summieren. Das könnte auch erklären, warum in seltenen Fällen auch nach einmaliger DMN-Applikation Lebertumore entstehen, nämlich dann, wenn sich eine entsprechende Anzahl von Zellen in der S-Phase befindet (Rabes 1979).

1.2. Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells

Der Lobus sinister lateralis weist nach Nitrosaminapplikation eine erhöhte Anzahl an EDB auf im Vergleich zu den anderen Leberlappen. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der Zellproliferation für diesen Befund untersucht und gefunden, daß diese im Lobus sinister lateralis nicht höher ist als in den anderen Lobuli.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob im Lobus sinister lateralis ein Alkylierungsmuster der DNA-Basen nachweisbar ist, das sich von den anderen Leber-

lappen unterscheidet. Besonders wichtig erscheint bei dieser Analyse das Verhalten des O^6 -Alkyl-Guanins, dem eine entscheidende Bedeutung bei der chemischen Cancerogenese zugeschrieben wird (siehe unter 1.2.3.).

Intakten, unbehandelten Ratten wurde eine einmalige Injektion von radioaktiv markiertem DMN verabreicht. Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet; die Leber wurde entnommen, in ihre einzelnen Lappen aufgeteilt und homogenisiert. Anschließend wurde die DNA nach der Methode von Kirby isoliert. Nach schwach saurer Hydrolyse wurden die DNA-Basen durch Säulenchromatographie getrennt. Guanin- und Adeningehalt der Fraktionen wurde photometrisch gemessen. Dann wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Aus dem Vergleich mit Markersubstanzen wurden die Alkylierungsprodukte identifiziert und hinsichtlich ihrer Quantität und Lappenzugehörigkeit ausgewertet.

1. MATERIAL UND METHODEN

1.1. Versuchstiere

Zehn männliche Ratten vom Stamm Wistar AF/Han, gefüttert mit Altromin-Standarddiät (Altromin, Lage, Lippe) und Trinkwasser, Gewicht 170 - 180 g, bekamen eine einmalige Injektion mit radioaktiv markiertem DMN. Die Injektion begann um 8⁰⁰ Uhr, zwischen jedem Tier lag ein Abstand von 10 Minuten.

2.2. DMN-Lösung

¹⁴C-DMN (New England Nuclear, Dreieichenhain), mit der spezifischen Aktivität von 46,75 mCi/mMol und einer Konzentration von 0,16 mg/ml in wässriger Lösung wurde mit nicht markiertem DMN (Merck-Darmstadt) auf eine Konzentration von 0,3824 mg/ml und eine Radioaktivität von 53,33 Ci/ml eingestellt. Bei einem Injektionsvolumen von 0,75 ml/200g KG entsprach dies einer Dosierung von 1,434 mg DMN/kg, bei einer applizierten Radioaktivität von 200 Ci/kg KG. Die spezifische Aktivität der injizierten Lösung betrug 10,3389 mCi/mMol.

2.3. Tötung der Tiere und Leberentnahme

Zwei Stunden nach erfolgter Injektion wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet, die Lebern entnommen, in einzelne Lappen getrennt und sofort in flüssigem Stickstoff

eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Leberlappen unter Zugabe von 5 Volumen eiskaltem SSC-Puffer (0,15 Mol NaCl und 0,015 Mol $C_6H_5Na_3O_7$) in einem Glas-Teflonhomogenisator im Eisbad homogenisiert und 20 Minuten bei 4°C und 2.500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet noch zweimal mit je 2,5 Volumen SSC-Puffer homogenisiert, dekantiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Kernpellet bei -25°C aufbewahrt.

2.4. DNA-Isolierung

Die DNA konnte nicht pro Ratte für jeden einzelnen der fünf Leberlappen isoliert werden, da das Gewicht eines Lappens für eine verwertbare DNA-Ausbeute zu gering ist. Für eine Säulenchromatographie sollten, wenn möglich, nicht weniger als 5g Lebergewebe zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden die Lappen mehrerer Tiere wie folgt zusammengefaßt:

a) Bezeichnung der einzelnen Leberlappen

- 1 = Lobus sinister lateralis
- 2 = Lobus medialis sinister et dexter
- 3 = Lobus dexter lateralis
- 4 = Processus caudatus
- 5 = Processus papillaris

Von den großen Leberlappen - Nr. 1 und Nr. 2 - wurden zweimal drei und einmal vier Lappen zusammen verarbeitet, von Nr. 3 und Nr. 5 zweimal fünf und bei dem kleinen Processus caudatus - Nr. 4 - mußte die Leber aller zehn Tiere für

eine DNA-Extraktion zusammengekommen werden.

b) Dementsprechend bezeichnen sich die Versuche:

- 1a - 1b - 1c (Lobus sinister lateralis)
- 2a - 2b - 2c (Lobus medialis sinister et dexter)
- 3a - 3b (Lobus dexter lateralis)
- 4 (Processus caudatus)
- 5a - 5b (Processus papillaris)

Die Isolierung der DNA erfolgte nach der Methode von Kirby (1957), modifiziert von Swann und Magee (1968).

Das Pellet wird in 1molarer NaCl (10 ml/g Leber) und 10 %iger Na-Dodecylsulfat-Lösung (1ml/g Leber) gelöst und nach Hinzugabe von Kirby-Reagenz (bestehend aus 500g Phenol, 70 ml m-Kresol, 0,5g 8-Hydroxychinolin und 55 ml H₂O; 10 ml/g Leber) 30 minuten bei Raumtemperatur in einem Schüttelbad geschüttelt, zentrifugiert (JA 20, 12000 U/min, 4°C, 30 min) und der Überstand abpipettiert. In diesem Schritt werden die Proteine von der DNA getrennt. Die DNA liegt in der wässrigen Phase des Zentrifugats als Na⁺-Salz vor. Alkohol, in dem das Na⁺-Salz nicht löslich ist, wird in äquivalenter Menge zum abpipettierten Überstand gegeben und die ausgefällte DNA als feinfädiges Netz entnommen. Mit Natriumacetat (2,5 ml/g Leber) wird die DNA wieder gelöst. Durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze RNA-ase (40 units/mg, Boehringer Mannheim) wird die RNA abgebaut. Die Lösung kommt anschließend in ein Schüttelwasserbad (37°C). Nach Zugabe von Aethoxyaethanol (2,5 ml/g Leber) bleiben die RNA-Abbauprodukte gelöst, das Na⁺-Salz

der DNA fällt aus. Die DNA wird entnommen und erneut unter Hinzugabe von gleichen Mengen (ca. 10 ml) H_2O , K_2HPO_4 und Methoxyethanol gelöst. Hierbei ist genau die Menge von Methoxyethanol zu beachten, denn wenn von diesem zuviel zugegeben wird, besteht die Gefahr, daß DNA bereits vor Beendigung der Reinigungsschritte ausfällt und damit verloren geht. Nach 30 Minuten Kühlung (4°C) und anschließendem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge (30 min bei 2100 U/min) wird die wässrige Phase abpipettiert. Durch Zugabe einer äquivalenten Menge 1-%iger CeTAB-Lösung (= Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid = $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) wird das Na^+ -Salz gefällt: Natrium wird durch das hydrophobe, in Alkohol lösliche, Cetyl ersetzt. Nach Entnahme der DNA und Waschen in Wasser wird das Cetyl durch Inkubation (20 min) in alkoholischem Na^+ -Acetat (1/3 der CeTAB-Menge) wieder durch Na^+ ersetzt und die DNA erneut durch Alkohol (10 ml) ausgefällt. Zum Schluß wird die DNA mit Alkohol-/Äthergemisch und mit reinem Äther gewaschen. Die gereinigte DNA wird im Vakuum getrocknet, unmittelbar danach gewogen und anschließend bei $+4^\circ\text{C}$ im Vakuum aufbewahrt.

2.5. Säulenchromatographie und photometrische Messung

Mit Hilfe der Säulenchromatographie können Substanzgemische in Einzelkomponenten mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt werden. Im vorliegenden Versuch wurde eine Sephadex-Gel-Filtration verwendet, um die al-

kylierten DNA-Basen quantitativ zu erfassen.

DNA der Rattenleber wurde 20 Stunden bei 37°C mit 5 ml 0,1 n HCl hydrolysiert; anschließend wurde der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von 1 n NaOH auf 6,8 eingestellt. 7-MeGua und 0^6 -MeGua wurden als Marker zugegeben. Anschließend wurde 1-2 Minuten mit 1500 U/min zentrifugiert. Das Hydrolysat wurde auf eine Sephadex G 10 - Säule (90 x 1,5 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben, als Laufmittel diente $\text{HCOONH}_4/\text{NaN}_3$. Es wurden 130 Fraktionen zu je 4,8 ml Eluat gesammelt und die Extinktionswerte ($d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$) in einem Zeiss PM Q II Spektrophotometer gemessen. Die Pyrimidine erscheinen zwischen Fraktion 10 - 25, Guanin zwischen 60 - 73 und Adenin zwischen 75 - 93.

2.6. Radioaktivitätsnachweis

Zu jeder Fraktion wurden 10 ml Szintillationslösung (1,5 l Toluene, 1 l Triton-100, 17,5 g PPO, Packard, Frankfurt a.M.) gegeben und die Aktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Instrument, Downers Grove, Ill) gemessen, Meßdauer 10 min je Probe.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ausbeute an DNA/Lebergewicht

Tabelle 1 gibt das jeweils verarbeitete Lebergewicht und die Menge der daraus isolierten DNA an. Die Unterschiede in der DNA-Ausbeute sind im Wesentlichen auf die Vielzahl der möglichen Fehlerquellen beim Vorgang der DNA-Isolierung zurückzuführen.

Da die DNA-Ausbeute von 1a - 1b - 1c und 2a - 2b - 2c recht unterschiedlich war, pro Säulenchromatographie jedoch wenn möglich mindestens 5 mg DNA zur Verfügung stehen sollten, wurde von 1c eine entsprechende Menge DNA zu 1a und von 2c zu 2a gegeben. Die DNA-Ausbeute von 3a - 3b und 5a - 5b wurde zu je einem Versuch vereinigt.

3.2. Berechnung der Gesamtmole Adenin und Guanin und ihre Bedeutung

Aus den im Spektrophotometer gemessenen Extinktionswerten für Adenin und Guanin lassen sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (ϵ für Guanin = $7,2 \times 10^3 \times 10^3$, ϵ für Adenin = $13,4 \times 10^3 \times 10^3$) die Gesamtmole Adenin und Guanin berechnen (siehe Tabelle 2). Das Verhältnis von Guanin zu Adenin ist in jeder DNA das selbe und bildet somit einen inneren Standard und damit eine Möglichkeit zur Erkennung größerer Fehler.

Lobus	Lebergewicht(g)	DNA(mg)	DNA(% v. Lebergewicht)
1a	7,86	2,99	38 x 10 ⁻³
1b	7,59	5,59	74
1c	10,24	10,6	104
2a	7,88	4,35	55
2b	7,71	5,53	72
2c	11,41	8,76	77
3a	5,68	2,43	43
3b	5,43	4,16	77
4	6,33	2,58	41
5a	4,26	1,72	40
5b	3,94	2,61	66

Tabelle 1: DNA-Ausbeute bezogen auf das Lebergewicht

1a - 1b - 1c	Lobus sinister lateralis
2a - 2b - 2c	Lobus medialis sinister et dexter
3a - 3b	Lobus dexter lateralis
4	Processus caudatus
5a - 5b	Processus papillaris

Lobus	Einwaage (mg DNA/Säule)	Gesamtakti- vität (dpm)	dpm/mg DNA	Mol Adenin $\times 10^{-6}$	Mol Guenin $\times 10^{-6}$	Quotient Mol (Ad/Gua)
1a	8,09	21923	2710	3,21	2,44	1,32
1b	5,585	16476	2950	2,99	2,52	1,19
1c	7,58	23499	3100	3,8	2,97	1,28
2a	4,751	13133	2764	2,63	2,06	1,28
2b	5,531	17398	3146	3,45	2,75	1,25
2c	8,755	38034	4344	4,79	3,73	1,28
3	7,4	23933	3234	3,43	2,99	1,15
4	2,583	15700	6078	1,5	1,22	1,23
5	4,333	26352	6068	2,48	1,93	1,28

Tabelle 2: Übersicht über die Gesamtmole der Purinbasen Adenin und Guenin, deren Verhältnis in jeder DNA dasselbe ist und als innerer Standard eine Möglichkeit zur Erkennung größerer Fehler bildet.

Der Quotient Ad/Gua liegt für alle Leberlappen in den neun Versuchen zwischen minimal 1,15 und maximal 1,32. Der Mittelwert beträgt 1,25. Somit liegen alle Werte innerhalb des Bereichs der doppelten Standardabweichung, d.h. es bestehen keine signifikanten Unterschiede.

Guanin ist die Bezugsgröße für quantitative Vergleiche der einzelnen entstandenen Alkylierungsprodukte. Sie werden für jedes Tier als molare Fraktion von Guanin angegeben.

3.3. Berechnung der Aktivität der einzelnen Fraktionen in dpm

Die im Szintillationszähler gemessene Aktivität der einzelnen Fraktionen wird in cpm ausgedruckt. Diese Werte werden auf Millimeterpapier gegen die 130 Fraktionen aufgetragen. Die cpm im Bereich der Fraktionen, in denen bekannterweise keine markierten Basen erscheinen (Fraktion 118 - 130), werden als Background-Aktivität gemittelt. Sie beträgt im Durchschnitt 30 cpm. Diese Background-Aktivität wurde von den cpm der einzelnen peaks abgezogen. Die Bestimmung der Meßausbeute für ^{14}C unter den verwendeten Meßbedingungen ergab 85%. Somit ergeben sich durch Multiplikation der cpm mit dem Faktor 1,17 die dpm. Berechnet man die dpm pro mg Einwaage DNA, so fällt auf, daß die Aktivität in den Lappen 4 und 5 erhöht ist (Tabelle 2). Zieht man von der Gesamtaktivität die Aktivität ab, die auf die Pyrimidine und die nicht identifizierten

Lobus	Gesamtaktivität	dpm/mg DNA
1a	15013	1856
1b	12261	2195
1c	16647	2196
2a	10929	2300
2b	14109	2551
2c	25461	2908
3	17489	2363
4	9258	3584
5	15022	3467

Tabelle 3: Gesamtaktivität und Aktivität/mg DNA
nach Abzug der Aktivität der Pyrimidi-
ne und der nicht identifizierten peaks.

peaks fällt, so reduziert sich die Aktivität/mg DNA, bleibt aber dennoch in diesen beiden Lappen erhöht (Tabelle 3).

Die korrigierten dpm dividiert durch $22,93 \times 10^9$ ergeben die dpm/mMol $\times 10^{-9}$. Die Zahl $22,93 \times 10^9$ ist errechnet worden aus der verwendeten spezifischen Aktivität von 10,3389 mCi/mMol. Ein mCi zerfällt in $2,22 \times 10^9$ dpm, die 10,3389 mCi zerfallen in $22,93 \times 10^9$ dpm.

Die dpm/mMol dividiert durch die Mole Guanin ergeben die molare Fraktion der alkylierten Base von Guanin.

3.4. Erläuterung der Radiochromatographien anhand eines Beispiels

a) Extinktionswerte

Die erste Spitze sind die Pyrimidine, die beiden anderen die Gesamtmenge an in der DNA enthaltenem Guanin und Adenin.

b) cpm-Peaks (Abb. 1)

Der erste große Peak (Fraktion 10 - 19) entspricht den Pyrimidinen. Die folgenden drei kleinen Peaks (Fraktion 20 - 25 / I, Fraktion 26 - 34 / II, Fraktion 35 - 40 / III) sind noch nicht identifiziert.

Die Alkylierungsprodukte erscheinen mit 3-Methyl-Adenin zwischen Fraktion 41 - 47, 7-Methyl-Guanin zwischen Fraktion 48 - 60, wobei der Wert am Wendepunkt der Kurve zur Hälfte 3-MeAd und 7-MeGua zuzurechnen ist, da er stets deutlich über dem Background-Wert liegt. O^6 -Methyl-Guanin

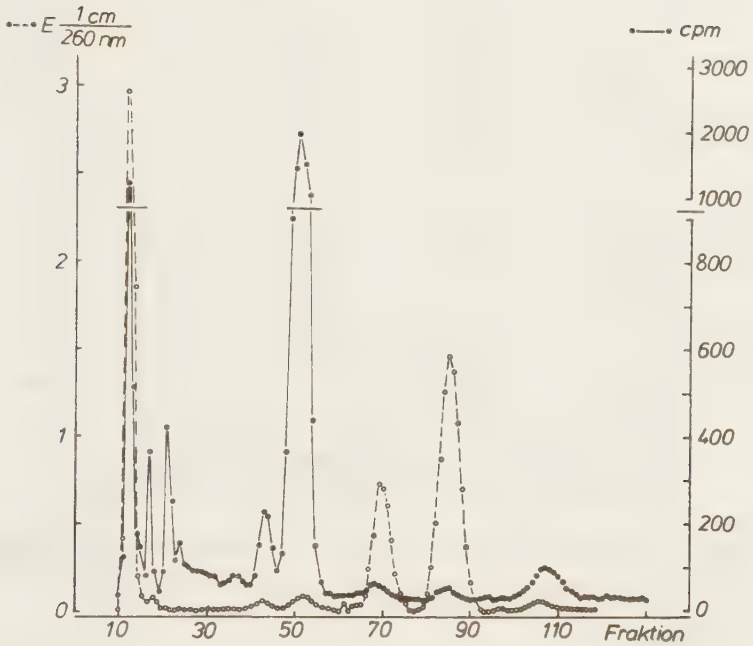


Abbildung A: Radiochromatogramm von DNA-Basen (DNA-Hydrolysat 5,585 mg) des *Lobus sinister lateralis* zwei Stunden nach Injektion von ^{14}C -DMN in einer Dosierung von 1,434 mg/kg (spezif. Aktivität 10,3389 mCi/mMol) bei Ratten.

Abszisse: Zahl der Fraktionen (4,9 ml pro Fraktion); Marker wurden zugegeben für 3-Methyl-Adenin, 7-Methyl-Guanin und O^6 -Methyl-Guanin. Fraktion 10 - 19 Pyrimidine, Fraktion 20 - 40 noch nicht identifizierte Peaks, Fraktion 41 - 47 3-Methyl-Adenin, Fraktion 48 - 60 7-Methyl-Guanin, Fraktion 95 - 115 O^6 -Methyl-Guanin.

Ordinate: Anzahl der dpm bzw. Extinktionswerte für Pyrimidine, Guanin und Adenin.

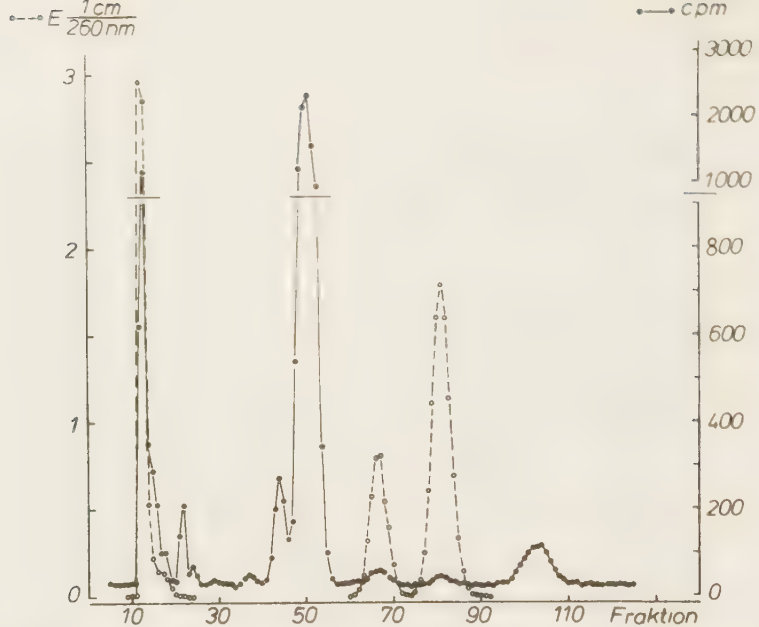


Abbildung B: Radiochromatogramm von DNA-Basen (DNA-Hydrolysat 5,531 mg) des Lobus medialis sinister et dexter

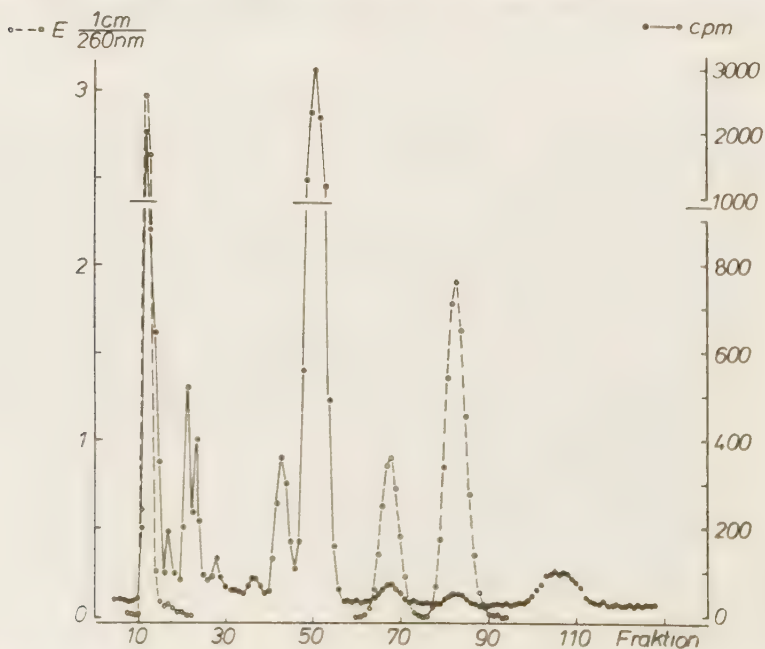


Abbildung C: Radiochromatogramm von DNA-Basen (DNA-Hydrolysat 7,4 mg) des Lobus dexter lateralis

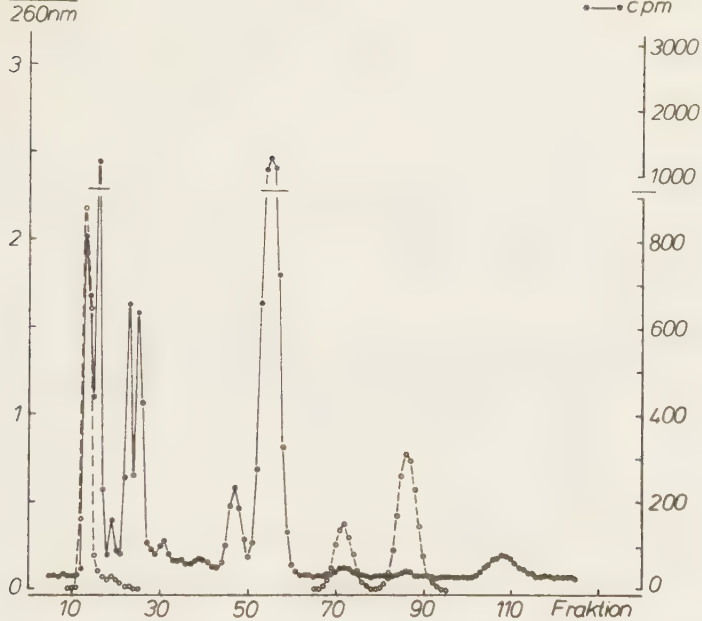


Abbildung D: Radiochromatogramm von DNA-Basen (DNA-Hydrolysat 2,583 mg) des *Processus caudatus*

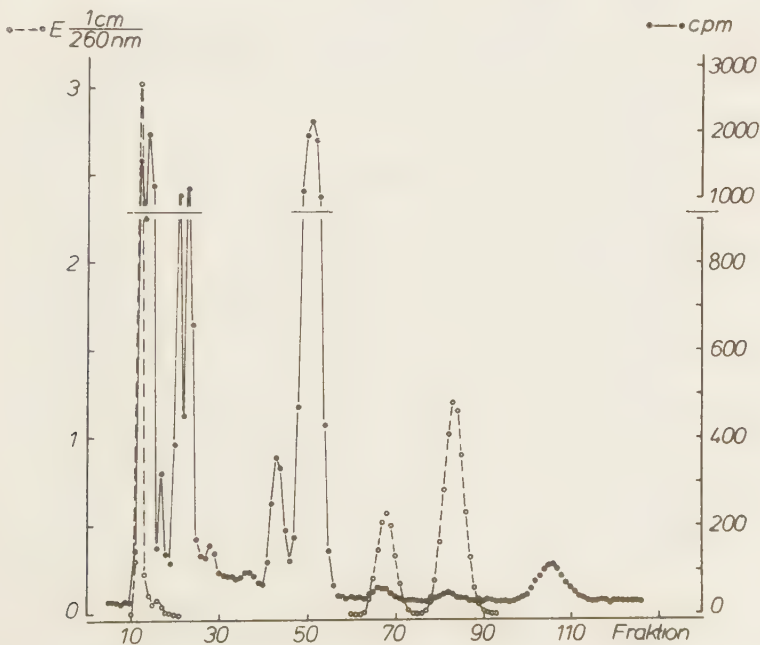


Abbildung E: Radiochromatogramm von DNA-Basen (DNA-Hydrolysat 4,333 mg) des *Processus papillaris*

erscheint zwischen Fraktion 95 - 115.

^{14}C -Guanin erscheint zwischen Fraktion 61 - 74, ^{14}C -Adenin zwischen Fraktion 75 - 88.

3.5. Vergleich der entstandenen Alkylierungsprodukte und des Quotienten $\text{O}^6/7$ -Methyl-Guanin nach Leberlappen

Tabelle 4 gibt die Mengen der entstandenen Basenalkylierungsprodukte in % von Guanin $\times 10^{-2}$ an. Die wichtigsten Produkte sind dabei 7-MeGua und O^6 -MeGua (Vergl. Allgem. Teil Punkt 1.1.3.). Sie entstehen beide in den Lappen 1 - 2 - 3 in etwa gleicher Menge, die Lappen 4 und 5 zeigen eine erhöhte Bildung dieser beiden Alkylierungsprodukte. Ebenso verhält es sich beim 3-MeGua.

Der Quotient $\text{O}^6/7$ -MeGua stellt eine Momentsituation dar, die in der Leber nach Alkylierung mit einer Konzentration von 1,434 mg DMN/kg KG und einer Lebensdauer von zwei Stunden nach Applikation des Nitrosamins vorliegt. Er ist die Summe der in diesem Zeitraum abgelaufenen Alkylierungs- und Reparaturvorgängen an diesen Basenpositionen. Der Quotient ist in allen Lappen nahezu identisch. Es wird in jedem der fünf Lobuli stets im selben Verhältnis O^6 - und 7-MeGua gebildet. Ferner kann man aus dem konstanten Quotienten schließen, daß, falls in einem Lappen mehr O^6 -MeGua entstanden wäre, in diesem Lappen auch mehr O^6 -MeGua repariert wurde.

Lobus	7-Methyl-Guanin	O ⁶ -Methyl-Guanin	Q(O ⁶ -/7-MeGua)	3-Methyl-Adenin
1a	2,06	0,14	0,068	0,21
1b	1,65	0,116	0,07	0,15
1c	1,88	0,125	0,067	0,2
2a	1,91	0,13	0,074	0,13
2b	1,83	0,126	0,069	0,14
2c	2,22	0,163	0,076	0,2
3	1,99	0,14	0,069	0,19
4	2,37	0,164	0,069	0,31
5	2,41	0,162	0,067	0,31

Tabelle 4: Alkylierungsprodukte und Quotient O⁶-7-Methyl-Guanin in % von Guanin x 10⁻²

3.6. Bedeutung von ^{14}C -Adenin und ^{14}C -Guanin

Die Menge an gebildetem ^{14}C -Adenin bzw. -Guanin entspricht der während der Versuchsdauer herrschenden Neusyntheserate an DNA in der Leber (Tabelle 5). Da sie in keinem Lappen deutlich erhöht oder vermindert ist, kann man von einer nahezu identischen Proliferationstätigkeit in jedem der fünf Lappen ausgehen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus Teil I. Auch die in den Autoradiographien bestimmte DNA-Syntheserate weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Lappen auf (vergl. Teil I, 3.2.).

3.7. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Der Quotient Adenin/Guanin ist in jedem Leberlappen nahezu der gleiche. Es handelt sich immer um die selbe "Ausgangs-DNA", die Werte sind, bezogen auf einen der DNA immanenten Standard miteinander vergleichbar.

Die Neusyntheserate an DNA ist ebenfalls in keinem Lappen deutlich erhöht oder vermindert. Man kann von einer gleichmäßigen Proliferationstätigkeit in jedem der fünf Leberlappen ausgehen.

Der Quotient $\text{O}^6\text{-}/7\text{-MeGua}$ ist in allen Lappen nahezu identisch. Bei den absoluten Zahlen für die entstandenen Alkylierungsprodukte fallen der Processus caudatus und papillaris mit erhöhten Werten auf.

Dasselbe gilt für die Aktivität/mg DNA, die auch nach Abzug der Werte für Pyrimidine und die nicht identifizierten Peaks in diesen beiden kleinsten Lobi deutlich erhöht ist.

Lobus	C ¹⁴ - Adenin	C ¹⁴ - Guanin	C ¹⁴ -Ad/C ¹⁴ -Gu
1a	0,026	0,032	0,81
1b	0,024	0,061	0,33
1c	0,025	0,045	0,56
2a	0,017	0,035	0,49
2b	0,02	0,033	0,61
2c	0,02	0,05	0,40
3	0,02	0,038	0,52
4	0,021	0,046	0,46
5	0,026	0,053	0,49

Tabelle 5: Während der Versuchsdauer neu gebildetes Adenin und Guanin
in % vom Gesamtguanin.

4. DISKUSSION

Der erste Teil der Arbeit führte zu dem Ergebnis, daß für das vermehrte Entstehen von EDB im Lobus sinister lateralis nicht eine erhöhte Grundproliferationstätigkeit in diesem Lappen verantwortlich ist.

Die Aufgabe dieses zweiten Teils war es, die Beziehung zwischen dem vermehrten Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis und der Menge des dort gebildeten O^6 -MeGua zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß im Lobus sinister lateralis nicht mehr O^6 -MeGua gebildet wird als in den anderen Leberlappen; insbesondere nicht mehr als im Lobus dexter lateralis, dem im Vergleich mit dem Lobus sinister lateralis am gründlichsten untersuchten Lappen.

4.1. Mögliche Ursachen der erhöhten Alkylierung der DNA im Processus caudatus und im Processus papillaris

Zu diskutieren ist hier zunächst eine erhöhte Proliferationstätigkeit in diesen beiden Lappen. Diese scheidet aufgrund der Zahlen für ^{14}C -Adenin und ^{14}C -Guanin aus. Gegen eine erhöhte Grundproliferation sprechen auch die Markierungsindices, die in den Versuchen des ersten Teils der Arbeit (siehe Tabelle 1) berechnet wurden. Hierbei zeigt sich weder bei den mit dem Cancerogen gefütterten, noch bei den ungefütteten Tieren eine erhöhte DNA-Synthese

in Form eines erhöhten Markierungsindex der Zellen.

Eine mögliche Erklärung wäre eine stärkere Durchblutung der beiden Lobuli, was ein vermehrtes DMN-Angebot bedeuten würde. Hierzu läßt sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage machen, da Ergebnisse zu Perfusionsversuchen an der Leber bezüglich der Durchblutung der einzelnen Leberlappen nicht vorliegen. Die einzige, uns zugängliche Literaturstelle (Fischer 1963) liefert nur allgemeine Angaben zur Leberdurchblutung, differenziert aber nicht zwischen einzelnen Lappen.

Eine andere Möglichkeit wäre eine vermehrte Enzym-Aktivität in diesen Leberlappen, insbesondere der α -Hydroxylasen, die das DMN aktivieren und damit den Alkylierungsprozeß einleiten (siehe unter 1.1.2.). Lappengetrennte Untersuchungen hierzu liegen ebenfalls noch nicht vor. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die Applikation von Nitrosomethylharnstoff, der spontan unter Bildung von Methyldiazonium zerfällt (Druckrey 1962), d.h. kein Enzymsystem zu seiner Aktivierung benötigt. Versuche mit diesem heterolytisch aktivierten Cancerogen könnten Klarheit darüber schaffen, ob man einen unterschiedlichen Enzymbesatz als Ursache erhöhter Alkylierung nach DMN ausschließen kann.

Aufschlußreich wären ferner Versuche zur Kinetik der DNA-Alkylierung und ihrer Reparatur, bei denen die Rattenleber nach unterschiedlichen Zeitspannen nach erfolgter Alkylierung zu untersuchen wäre. Es wäre denkbar, daß in kurzen

Intervallen nach Alkylierung die Verhältnisse zwischen O^6 - und 7-MeGua in den einzelnen Leberlappen anders liegen als nach zwei Stunden, wie in dem vorliegenden Versuch. Solche Versuche liegen bisher nur für die Gesamtleber, nicht aber unterschieden nach Leberlappen vor. Es ergaben sich in den ersten Minuten Hinweise für eine schnelle Eliminierung des O^6 -MeGua bei gleichzeitigem dosisabhängigen Anstieg des 7-MeGua (Rabes 1982 b).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Klärung wäre schließlich die Erweiterung der Versuche mit unterschiedlichen DMN-Dosierungen. Es wäre möglich, daß bei der hier verwendeten Dosis das Reparatursystem in dem Processus caudatus und papillaris bereits erschöpft ist. Für die Gesamtleber haben sich Anzeichen einer Erschöpfbarkeit der O^6 -MeGua-Eliminierung bei höheren DMN-Dosen ergeben (Pegg 1977 b).

Beim Vergleich der Werte für die DNA-Basenalkylierung darf nicht übersehen werden, daß für die Lappen 4 und 5 nur je ein Wert zur Verfügung steht. Daher können diese Einzelwerte nicht weiter gesichert werden. Ferner liefert auch der Versuch 2c erhöhte Werte für 7-MeGua und O^6 -MeGua, die sehr wahrscheinlich durch Fehler in der Methode bedingt sind und damit einer Kontrolle bedürfen.

4.2 Zum Quotienten O^6 -/7-Methyl-Guanin

Der Quotient ist in allen Leberlappen nahezu gleich, auch

in den Lappen 4 und 5. Das kann bedeuten, daß in jedem Leberlappen stets im gleichen Verhältnis 0⁶- und 7-MeGua gebildet werden. Ob sich der Quotient bei längeren oder kürzeren Intervallen zwischen der einmaligen DMN-Injektion und der Leberentnahme ändert, könnte durch Kinetikversuche mit gestaffelten Zeitintervallen zwischen DMN-Injektion und Leberentnahme geklärt werden.

4.3. Direkter Vergleich Lobus sinister lateralis - Lobus dexter lateralis

Das vermehrte Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis wurde besonders im Vergleich zum Lobus dexter lateralis untersucht. Dabei ist für die Aussagekraft der Werte allerdings zu berücksichtigen, daß für den Lobus dexter lateralis aufgrund der geringen Lebermenge nur jeweils ein Wert vorliegt. Dieser kann auch nicht durch einen Vergleich mit anderen Versuchen gleicher Versuchsanordnung verifiziert werden, da eine Untersuchung der Alkylierungsprodukte getrennt nach Leberlobi früher noch nicht vorgenommen worden ist. Die beiden Lobi weisen keine signifikanten Unterschiede auf bei der Neusynthese von Adenin und Guanin. Das bestätigen auch die Zahlen zur Zellproliferation aus Teil I. Die Markierungsindices sind nicht signifikant verschieden. Gleiche Ergebnisse finden sich auch bei den Alkylierungsprodukten. Insbesondere ist 7-MeGua als Indikator dafür zu betrachten, daß in jedem Lappen gleich viel DMN in die ul-

timele Wirkform überführt wird. Im Quotienten O^6 -/7-MeGua zeigen sich fast identische Werte. Auch die Aktivität/mg DNA ist im Lobus dexter lateralis nur geringfügig höher als im Lobus sinister lateralis.

4.4 Zur Bedeutung des gebildeten O^6 -Methyl-Guanin und seiner Eliminierung für die Lebercancerogenese

Aufgrund der Ergebnisse liegt der Schluß nahe, daß die Menge des gebildeten O^6 -MeGua zumindest nicht die alleinige Ursache des vermehrten Auftretens von EDB im Lobus sinister lateralis sein kann. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, ergeben die endgültige Klärung dieser Fragen jedoch erst Versuche mit unterschiedlichen Zeitspannen zwischen Alkylierung und Tötung der Tiere. Es könnte sein, daß unmittelbar nach Cancerogen-Exposition der Lobus sinister lateralis einen erhöhten Wert für O^6 -MeGua aufweist, der eine Stunde nach Alkylierung durch Reparaturvorgänge bereits wieder abgefallen ist. Ein irrumsanfälliger Reparaturmechanismus wäre vorstellbar. Fehlerhafte Reparaturen können zu Mutationen führen. Da bisher keine Versuche zur Kinetik der Bildung und Eliminierung des O^6 -MeGua getrennt für die einzelnen Lappen der Rattenleber vorliegen, sind Überlegungen zur veränderten Reparatur oder Persistenz des O^6 -MeGua bisher rein spekulativ.

Da nach den bisher vorliegenden Daten O^6 -MeGua im Lobus sinister lateralis in gleichem Maß entstanden ist wie in

anderen Lobi, so müßte als Erklärung für das vermehrte Auftreten von EDB im Lobus sinister lateralis noch eine weitere Belastung für die Zelle als Voraussetzung für die Transformation postuliert werden, z.B. eine erhöhte Proliferationsaktivität in diesem Lappen (Den Engelse 1974, De Munter 1979, O'Connor 1981). Dafür liefert aber Teil I keinen Hinweis. Der Lobus sinister lateralis zeigt in den Versuchen mit ^3H -Thymidin-Markierung keine gegenüber den anderen Lobi erhöhte Proliferationsrate.

Wahrscheinlich besteht kein direkter Kausalzusammenhang zwischen dem absoluten Wert von $\text{O}^6\text{-MeGua}$ und der Karzinomentstehung in einem Gewebe. Darauf weist auch die Tatsache hin, daß nicht immer in den Organen, in denen $\text{O}^6\text{-MeGua}$ am höchsten und längsten nachweisbar ist, Tumoren entstehen (Margison 1977, Bücheler 1977, Cooper 1978, Swenberg 1979). Es wird z.B. in der Rattenleber, dem Ort der bevorzugten Karzinomentstehung, viel schneller eliminiert als im Gehirn (Pegg 1977). Diese Tatsache könnte wiederum die These über die Bedeutung eines irrtumsanfälligen Reparaturmechanismus unterstützen.

Die Effizienz der $\text{O}^6\text{-MeGua}$ -Eliminierung ist dosisabhängig (Pegg 1977). Sie ist nach kleinen Dosen effektiver als nach großen. Dies könnte bedeuten, daß es eventuell eine bestimmte Grenzdosis für alkylierende Cancerogene gibt, unterhalb derer keine Tumore entstehen. Beim Entstehen nur geringer DNA-Läsionen könnten Reparaturvorgänge effi-

zient genug für eine Eliminierung des Schadens sein. Gegen eine bestimmte cancerogene Grenzdosis spricht aber die Tatsache, daß selbst nach äußerst kleinen, kontinuierlich verfütterten Dosen Tumore entstehen. Das spricht entweder für die zunehmende Erschöpfbarkeit des Reparaturmechanismus oder für die mit vermehrter Reparatur verbundene Irrtumsanfälligkeit dieses Vorganges. Dabei ist die anfängliche Adaptions-Reparatur dosisabhängig (Pegg 1977).

Nach einer einmaligen kleinen Dosis entstehen an der Leber keine Tumore. Treffen diese geringen Dosen jedoch eine proliferationsaktive Zellpopulation, sei es, daß neugeborene Ratten oder partiell hepatektomierte, adulte Tiere exponiert werden, so entstehen auch in diesen Fällen Tumore (Craddock 1974, Magee 1975, 1976, Pegg 1977). Offenbar ist nicht ein Faktor allein entscheidend für die maligne Transformation einer Zelle, sondern das Zusammentreffen mehrerer Faktoren. In den vorliegenden Untersuchungen könnten Wechselbeziehungen zwischen Leberdurchblutung, Cancerogenmetabolismus, DNA-Alkylierung, DNA-Reparaturkinetik und proliferativem Status der Zielzellpopulation entscheidend für die Realisation der Transformation sein. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Leberlobi sind so gering, daß sie mit den verwendeten Methoden nicht objektiviert werden konnten. Die Leber besteht aus mehr als 10^8 Zellen, und die Transformation ei-

ner einzigen Zelle ist potentiell zur clonogenen Entstehung einer praeneoplastischen Population ausreichend (Rabes 1982 a).

ZUSAMMENFASSUNG

Diäthylnitrosamin (DÄNA) erzeugt in der Rattenleber in einer Dosierung von 5 mg/kg/Tag nach einer Latenzzeit von 130 - 150 Tagen Hepatome und hepatozelluläre Karzinome. Während der Latenzzeit vollziehen sich Veränderungen im Enzymaktivitätsmuster sowie im Proliferationsverhalten einzelner Zellgruppen, die mittels enzymhistochemischer und autoradiographischer Methoden nachgewiesen werden können. Zwischen diesen sogenannten Enzymdefektbezirken und den später entstehenden Tumoren besteht ein, im Einzelnen zwar noch nicht endgültig geklärter, jedoch sicherer Zusammenhang. So treten im Lobus sinister lateralis, in dem zuerst und vermehrt Tumore entstehen, vermehrt Enzymdefektbezirke auf.

Im ersten der vorliegenden Versuche wird untersucht, ob der Lobus sinister lateralis eine vermehrte basale Proliferationsaktivität aufweist, da dies eine mögliche Ursache des vermehrten Auftretens von EDB in diesem Leberlappen darstellen könnte. Jugendliche männliche Ratten (Wistar AF/Han) erhielten 5 mg DÄNA/kg/Tag für 23 Tage. Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurden die DNS-synthetisierenden Zellen mit ^3H -Thymidin markiert. Um die gesamte Wachstumsfraktion zu erfassen, erhielten diese Tiere intraperitoneal neun ^3H -Thymidin-Injektionen in 6-stündigen Intervallen. Eine Stunde nach der letzten Injektion wurde den Tieren die Leber entnommen. Aus Kryostatserienschnitten wurden Autoradiogra-

phien hergestellt. Zur Feststellung des Markierungsindex wurden pro Präparat mindestens 5000 Hepatozyten gezählt, zu gleichen Teilen periportal und perivenös. Eine Kontrollgruppe nicht DÄNA-gefütterter Tiere wurde ebenfalls so behandelt und ausgewertet.

Der Markierungsindex der Hepatozyten weist für keinen der fünf Leberlobi eine Tendenz zu vermehrter oder verminderter Proliferationsaktivität auf. Insbesondere der Lobus sinister lateralis unterscheidet sich nicht von den übrigen Leberlappen. Das gilt für die DÄNA-gefütterten Tiere wie für die Kontrolltiere.

Im Vergleich der Markierungsindices der Leber DÄNA-gefütterten Tiere mit denen der Kontrolltiere ergeben sich keine Hinweise für eine insgesamt erhöhte Proliferationsaktivität bei DÄNA-Exposition.

Ein entscheidender Vorgang bei der Induktion präneoplastischer Veränderungen in der Leber durch DÄNA ist die Alkylierung der DNA-Purinbasen. Das Hauptalkylierungsprodukt ist 7-Alkyl-Guanin, das aber in keiner quantitativen Korrelation zur Induktion von Tumoren steht. Eine wichtigere Bedeutung für die Initiation der Carcinogenese kommt dem O⁶-Alkyl-Guanin zu. Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. Fehlbasenpaarungen werden diskutiert.

Im zweiten Versuch dieser Arbeit sollte daher untersucht

werden, ob eine mögliche Ursache des vermehrten Entstehens von EDB und Tumoren im Lobus sinister lateralis ein zu den anderen Leberlappen unterschiedliches Alkylierungsmuster nach DÄNA-Exposition vorliegt.

Männlichen Ratten (Wistar AF/Han) wurde eine einmalige Injektion von radioaktiv markiertem DMN (1,434 mg DMN/kg KG) verabreicht. Zwei Stunden nach der Injektion wurden die Lebern entnommen und in ihre Lappen geteilt. Die nach der Methode von Kirby isolierte DNA wurde durch Säulenchromatographie in die einzelnen Purinbasen getrennt. Guanin- und Adeningehalt der Fraktionen wurde photometrisch gemessen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt, die Alkylierungsprodukte durch den Vergleich mit Markersubstanzen identifiziert und bezüglich Quantität und Lappenzugehörigkeit ausgewertet.

7-Methyl-Guanin, O⁶-Methyl-Guanin und 3-Methyl-Adenin entstanden im Lobus sinister lateralis, Lobus medialis sinister et dexter und im Lobus dexter lateralis in gleicher Menge. Processus caudatus und papillaris wiesen eine erhöhte Bildung dieser Alkylierungsprodukte auf.

Der Quotient O⁶-/7-Methyl-Guanin ist in allen Leberlappen nahezu identisch.

¹⁴C-Adenin und ¹⁴C-Guanin, deren Bildung während der Versuchsdauer stattfindenden DNA-Synthese entspricht, ist in keinem Lappen deutlich erhöht oder vermindert.

Die Ergebnisse zeigen, daß die vermehrte Bildung von praeneoplastischen, enzymdefizienten Subpopulationen im Lobus sinister lateralis und das verstärkte Auftreten von Tumoren in diesem Lappen nicht direkt mit einer gesteigerten DNA-Alkylierung, Reparatur oder Veränderungen in der Proliferationsaktivität in diesem Leberabschnitt zu korrelieren sind. Es ist zu vermuten, daß im Lobus sinister lateralis eine besonders carcinogensensitive Subpopulation enthalten ist, deren besondere Eigenschaften mit den in dieser Untersuchung angewendeten Methoden nicht erfaßt werden konnte.

LITERATURVERZEICHNIS

ABDULNUR S.F. and FLURRY Jr. R.L.

Effect of guanine alkylation on mispairing. Nature 264:
369 (1976)

ALTMANN H.-W.

Der Zellersatz insbesondere an den parenchymatösen Organen.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 50: 15 - 51 (1966)

BANNASCH P.

Nitrosamin-induzierte Glykogenose und Geschwulstbildung
in der Rattenleber. Ver.Dtsch.Ges.Path. 51: 343 (1967)

BREWER J.M., PESCA A.J. and ASHWORTH R.B.

Experimentelle Methoden in der Biochemie. Gustav Fischer-
Verlag, Stuttgart-New York, 1977

BUCHER N.L.R. and M.N. SWAFFIELD

The Rate of Incorporation of Labelled Thymidine into the
Deoxyribonucleic Acid of Regenerating Rat Liver in Rela-
tion to the Amount of Liver Excised. Cancer Res. 24:1611 (1964)

BÜCHELER J. and KLEIHUES P.

Excision of O⁶-methylguanin from DNA of various mouse
tissues following a single injection of N-methyl-N-nitro-
sourea. Chem. Biol.Interactions 16: 325-333 (1977)

CAPPS M.J., O'CONNOR P.J. and CRAIG A.W.

The influence of liver regeneration on the stability of

methylguanine in rat liver DNA after treatment with N,N-dimethylnitrosamine. *Biochemica et Biophysica Acta* 331: 33-40 (1973)

CARVER J.H., HATCH F.T. and BRANSCOMB E.W.

Estimating maximum limits to mutagenic potency from cytotoxic potency. *Nature* 279: 154-156 (1979)

CAYAMA E., ISUDA H., SARMA D.S.R. and FARBER E.

Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* 275: 60-62 (1978)

CRADDOCK V.M. and MAGEE P.M.

Reaction of the carcinogen dimethylnitrosamine with nucleic acids in vivo. *Biochem.J.* 89: 32 (1963)

CRADDOCK V.M. and MAGEE P.M.

Analysis of bases of rat liver nucleic acids after administration of the carcinogen dimethylnitrosamine. *Biochem.J.* 100: 724 (1966)

CRADDOCK V.M.

Stability of deoxyribonucleic acid methylated in the intact animal by administration of dimethylnitrosamine. *Biochem.J.* 111: 497-502 (1969)

CRADDOCK V.M.

The pattern of methylated purines formed in DNA of intact and regenerating liver of rats treated with the carcinogen dimethylnitrosamine. *Biochemica et Biophysica Acta* 312: 202-210 (1973)

COOPER H.K., BÜCHELER J. and KLEIHUES P.

DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1,2 dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 38: 3063-3065 (1978)

DE MUNTER H.K., DEN ENGELSE L. and EMMELOT P.

Studies on lung tumors. Iv. Correlation between H^3 -thymidine labeling of lung and liver cells and tumour formation in GRS/A and C3Hf/A male mice following administration of dimethylnitrosamine. *Chem.Biol.Interactions* 24: 299-316 (1979)

DEN ENGELSE L.

The formation of methylated bases in DNA by dimethylnitrosamine and its relation to differences in the formation of tumours in the livers of GR and C3Hf mice. *Chem.Biol.Interactions* 8: 329-338 (1974)

DESCHNER E.E.

Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon. *Z.Krebsforsch.* 91: 205-216 (1978)

DRUCKREY H., PREUSSMANN R., SCHMÄHL D. und MILLER M.

Chemische Konstitution und karzinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Naturwiss.* 48: 134 (1961)

DRUCKREY H., SCHMÄHL D., DISCHLER W. und SCHILDBACH A.

Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.

Die Naturwissenschaften 10: 217-228 (1962/a)

DRUCKREY H. und SCHMÄHL D.

Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.

Die Naturwissenschaften 49: 218 (1962/b)

DRUCKREY H., STEINHOFF D., PREUSSMANN R. und IVANKOVIC S.

Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. Zeitschr. für Krebsforsch. 66: 1-10 (1964)

DRUCKREY H., PREUSSMANN R., IVANKOVIC S. und SCHMÄHL D.

Organotrope karzinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Zeitschr. für Krebsforsch. 69: 103-201 (1967)

ELIAS H.

Carcinoma of the liver in man. Edited by Ch. Rouiller
"The Liver" Vol. II, 329 Academic Press New York and
London, S.63-84 (1963)

EMMELOT P. and BENEDETTI E.L.

Changes in the fine structure of rat liver cells brought about by dimethylnitrosamine. J.Biophys. Biochem. Cytol. 7: 393 (1960)

FABER E.

Biochemistry of carcinogenesis. Cancer Research 28:
1859-1869 (1968)

FIALA S. and FIALA A.E.

The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. J.Cell.Biol. 36: 551-565 (1968)

FIALA S. and FIALA A.E.

On the correlation between metabolic and structural changes during carcinogenesis in rat liver. Brit.J.Cancer 13: 136-151 (1959/a)

FIALA S. and FIALA A.E.

Intracellular localisation of carcinogen and its relationship to the mechanism of carcinogenesis in rat liver. Brit.J. cancer 13: 236 (1959/b)

FRIEDRICH-FREKSA H., GÜSSNER W. und BÜRNER P.

Histochemische Untersuchungen der Kanzerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von DÄNA. Ztschr. für Krebsforsch.72: 226 (1969/a)

FRIEDRICH-FREKSA H., PAPADOPULU G. und GÜSSNER W.

Histochemische Untersuchungen in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von DÄNA. Zeitschr. für Krebsforsch. 72: 240 (1969/b)

FRIEDRICH-FREKSA H., GÜSSNER W. and BÜRNER P.

Immunological defence against preneoplastic stages of dimethylnitrosamine-induced carcinomas in rat liver. Nature 223: 1162 (1969/c)

GOTH R. and RAJEWSKY M.F.

Persistence of O⁶-ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71: 639-643 (1974)

HANAWALT P.C., COOPER P.K., GANESAN A.K. and SMITH CH.A.

DNA repair in bacteria and mammalian cells. Am.Rev.Biochem. 48: 783-836 (1979)

HARD G.C.

Autoradiographic analysis of proliferative activity in rat kidney epithelial and mesenchymal cell subpopulations following a carcinogenic dose of dimethylnitrosamine. Cancer Res. 35: 3762-3773 (1975)

KIRBY K.S.

A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids. Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. Biochem.J. 66: 495-504 (1957)

KLEIHUES P. and MARGISON G.P.

Exhaustion and recovery of repair excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA. Nature Vol. 259: 153-155 (1976)

KLEIN G. and WEINHOUSE S. (eds)

Advances in Cancer Research, Vol. 25 (1977), Academic Press New York, San Francisco, London, S.195 - 269: v. Pegg A.E.

"formation and metabolism of alkylated nucleosides. Possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents".

KNECHT M.

Untersuchungen über eine mikrosomale N-Dimethylase in verschiedenen Organen der Ratte in vivo. Zschr.Naturforsch.

21 b: 799 (1966)

KNECHT M.

Verteilung und Verweilzeit von Dimethylnitrosamin im Organismus der Ratte. Zeitschr.f.Krebsforsch. 69: 293-296 (1967)

LAWLEY P.D. and BROOKS P.

Acidic dissociation of 7:9-dialkylguanines and its possible relation to mutagenic properties of alkylating agents. Nature 192: 1081 (1961)

LAWLEY P.D. and THATCHER C.J.

Methylation of deoxyribonucleic acid in cultures mammalian cells by N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine. Biochem.J. 116: 693-707 (1970)

LAWLEY P.D. and SHAW S.A.

Methylation of ribonucleic acid by the carcinogen dimethyl sulphate, N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Biochem.J. 128: 117-139 (1972)

LAWLEY P.D., ORR D.J., SHAH S.A., FARMER P.B. and JARMAN M.

Reaction products from N-methyl-N-nitrosourea and deoxyribonucleic acid containing thymidin residues. Biochem.J. 135: 193-201 (1973)

LINDAHL T.

DNA-glykosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites and base-excision-repair. Prog.Nucleic Acid Res.Mol. Biol.22: 135-192 (1979)

LOEB L.A., SPRINGGATE C.F. and BATTULA N.

Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. Cancer Res. 34: 2311 (1974)

LOUD A.V.

Description of the ultrastructure of normal rat liver parenchym cells. J.Cell.Biol. 37: 27-46 (1968)

LOVELESS A.

Possible relevance of O -alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. Nature 223: 206 (1969)

LUDEC E.H.

Regeneration of the liver. Edited by Ch.Rouiller in "The Liver" Vol.II, Academic Press New York and London, S.63-84 (1963)

MAGEE P.N.

Toxic liver injury. The metabolism of dimethylnitrosamine. Biochem.J. 64: 676 (1956)

MAGEE P.N. and FARBER E.

Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of the

rat liver with nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem.J.* 83: 114-124 (1962)

MAGEE P.N. and BARNES J.M.

Carcinogenic nitroso compounds advanc. *Cancer Res.* 10: 163-246 (1967)

MAGEE P.N.

Activation and Inactivation of chemical carcinogens and mutagens in the mammal. In: Campbell PN, Dickens F (eds) *Essays in biochemistry*, Vol 10. Academic Press (for the Biochemical Society), London, New York, San Francisco, pp 105-136 (1974)

MAGEE P.N., PEGG A.E. and SWANN P.F.

Molecular mechanism of chemical carcinogenesis. *Handb.d. Allgem.Path.* VI/6 S.329-419 (1975)

MARGISON G.P., MARGISON J.M. and MONTESAND R.

Accumulation of O⁶-methyl-guanine in non-target-tissue deoxyribonucleic acid during chronic administration of dimethylnitrosamin. *Biochem.J.* 165: 463-468 (1977)

MARGISON G.P., CURTIN N., SNELL K. and CRAIG A.W.

Effect of chronic administration of N,N-dimethylnitrosamine on the excision of O⁶-ethylguanine from rat liver DNA. *Br.J.Cancer* 40: 809-813 (1979/a)

MARGISON G.P. and O-CONNOR P.J.

Nucleic acid modification by N-nitroso compounds. In: Grover

PL (ed) Chemical carcinogens and DNA, Vol I. CRC Press,
Boca Raton/Florida pp 111-159 (1979/b)

MILLER E.C.

Some current perspectives on chemical carcinogenesis in
humans and experimental animals: presidential address Cancer
Res. 38: 1479-1496 (1978)

MONTESAND R., BRESIL H., PLANCHE-MARTEL G., MARGISON G.P.
and PEGG A.E.

Effect of chronic treatment of rats with dimethylnitrosamine
on the removal of O⁶-methylguanine from DNA. Cancer Res. 40:
452-458 (1980)

OLSSON M. u. Lindahl T.

Repair of alkylated DNA in Escherichia coli. Methyl
group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cys-
tein residue. J. Biol. Chem. 255: 10569 - 10571 (1980)

PEGG A.E.

Formation and metabolism of alkylated nucleosides: possible
role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating
agents. In: Advances in Cancer Research, H.Klein and S.Wein-
house, Vol.25, Academic Press New York, San Francisco, London,
S.195-269 (1977/a)

PEGG A.E.

Alkylation of rat liver DNA by dimethylnitrosamine: effect
of dosage on O⁶-methyl-guanine levels. J.Natl.Cancer Inst.
58: 681-687 (1977/b)

PEGG A.E.

Dimethylnitrosamine inhibits enzymatic removal of O⁶-methyl-guanine from DNA. *Nature* 274: 182-184 (1978/a)

PEGG A.E.

Enzymatic removal of O⁶-methylguanine from DNA by mammalian cell Extracts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 84: 166-173 (1978/b)

RABES H.M. and BRÄNDLE H.

Synthesis of RNA, protein and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *Cancer Res.* 29: 817-822 (1969)

RABES H.M., HARTENSTEIN R. and SCHOLZE P.

Specific stages of cellular response to homeostatic control during DÄNA-induced liver carcinogenesis. *Separatum Experimentia* 26: 1376, Birkhäuser Verlag, Basel (1970/a)

RABES H.M. und TUCZEK H.-V.

Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. *Virchows Arch.Abt.B Zellpath.* 6: 302-312 (1970/b)

RABES H.M. and ZETTLER C.

Relation between Preneoplastic Lesions, Cell Proliferation and Development of Carcinoma in the Liver after Discontinuos Application of Dimethylnitrosamine. XI.Inter.Cancer Congreß Florenz (1970)

RABES H.M.

Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. Reprinted from *Progress in Liver Diseases*, Vol. V, edited by Hans Popper, M.D., Ph.D. and Fenton Schaffner, M.D., M.S. c 1976/a by Grune & Stratton, Inc.

RABES H.M., WIRSCHING R., TUCZEK H.-V. and ISELER G.

Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. Cell Tissue Kinet. 9: 517-532 (1976/b)

RABES H.M., ISELER G., CZICHOS S. and TUCZEK H.-V.

Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. Cancer Res. 37: 1105-1111 (1977)

RABES H.M.

Cell kinetics of hepatocytes during the preneoplastic period of DÄNA-induced liver carcinogenesis. Cancer Res. 39: 1298-1304 (1979)

RABES H.M.

Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. Reprinted from "Hepatotrophic factors", Ciba Foundation Symposium 55 (new series) (Febr. 1978)

RABES H.M.

Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation. Verh.Dtsch.Ges.Path. 63: 18-39 (1979/a)

RABES H.M., KERLER R., WILHELM R., RHODE G. and RIESS H.

Alkylation of DNA and RNA by ¹⁴C-dimethylnitrosamine in hydroxyurea-synchronized regenerating rat liver. Cancer Res. 39: 4228-4236 (1979/b)

RABES H.M., SCHNEIDER M., KAHNMAN A., ELNER L. and GUNDEL J.M.

Clonal Growth of Carcinogen-induced Enzym-deficient Pre-neoplastic Cell Populations in Mouse Liver. Cancer Res. 42: 3220-3227 (1982/a)

RABES H.M., WILHELM R. and RODE G.

Dose and Cell Cycle-Dependent O^6 -Methylguanine Elimination from DNA in Regenerating Rat Liver after 14 C-Dimethylnitrosamine. Cancer Res. 42: 3814-3821 (1982/b)

RAJEWSKI M.F.

Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumor growth and carcinogenesis. Zellschr.Krebsforsch. 78: 12-30 (1972)

RAPPAPORT A.M., BOROWY Z.J., LONGHEED W.M. and LOTTO W.N.

Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Anat.Rec. 119: 11-33 (1954)

RAPPAPORT A.M.

Acinar units and the pathophysiology of the liver, in: "The liver", Academic Press London, S.625 (1963)

RENNER H.

The role of the liver in drug metabolism. Am.J.Med. 49: 617-629 (1970)

ROBINS P. and CAIRNS J.

Quantitation of the adaptive response to alkylating agents.
Nature (Lond) 280: 74-76 (1979)

ROGERS K.J. and PEGG A.E.

Foramtion of O⁶-methylguanine by alkylation of rat liver,
colon and kidney DNA following administration of 1,2 dime-
thylhydrazine. Cancer Res. 37: 4082-4088 (1977)

SCHAUER A.

Histochemische und biochemische Untersuchungen der Canceri-
sierung mit DÄNA an der Rattenleber. Verh.Dtsch.Ges.Path.
50: 344-347 (1966)

SCHAUER A. und KUNZE E.

Enzymhистоchemische und autoradiographische Untersuchungen
während der Cancerisierung der Rattenleber mit DÄNA. Zschr.
Krebsforsch. 70: 252 (1968)

SCHMÄHL D., PREUSSMANN R. und HAMPERL H.

Leberkrebserzeugende Wirkung von DÄNA nach oraler Gabe bei
Ratten. Naturwisschsch. 47: 89 (1960)

SINGER B.

The chemical effects of nucleic acid alkylation and their
relation to Mutagenesis and Carcinogenesis. Progr.Nucl.
Acids.Res.molec.Biol. 15: 219-284 (1975)

SINGER B. and FRAENKEL-CONRAT H.

The specificity of different classes of ethylation agents

towards various sites in RNA. Biochemistry 14: 772-782 (1975)

SINGER B.

All oxygens in nucleic acids react with carcinogenic ethylating agents. Nature 264: 333-340 (1976)

STEWART B.W. and MAGEE P.N.

Effect of a single dose of dimethylnitrosamin on biosynthesis of nucleic acid and protein in rat liver and kidney. Biochem.J. 125: 943-952 (1971)

STÖCKER E., TEUBNER E. und ROSENBUSCH S.

Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. Verh.Dtsch.Ges.Path. 48: 295-299 (1964)

STÖCKER E.

Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh.Dtsch. Ges.Path. 50: 53-74 (1966)

STRAUSS B., TATSUMI K., KARRON P., HIGGINS N.P., BENASHER E., ALTAMIRANO-DIMAS M., ROSENBLATT L. and BOSE K.

Mechanism of DNA excision repair in human cells. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, Vol.2: 177-201 (19)

SUN L. and SINGER B.

The specificity of different classes of ethylating agents toward various sites of HeLa cell DNA in vitro and in vivo. Biochemistry 14: 1795-1802 (1975)

SWANN P.F. and MAGEE P.N.

Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nu-

cleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethyl-nitrosamine, dimethylsulphate and methyl-methanesulphonate. Biochem.J. 110: 39-47 (1968)

SWENBERG J.A., COOPER H.K., BÜCHELER J. and KLEIHUES P.

1,2 Dimethylhydazine-induced methylation of DNA bases in various rat organs and the effect of pretreatment with disulfiram. Cancer Res. 39: 464-467 (1979)

THOMAS C.

Zur Morphologie der durch DÄNA erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. Zschr.Krebsforsch. 64: 224 (1961)

TUCZEK H.V. und RABES H.M.

Verlust der Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten nach subtotaler Hepatektomie. Separatum Experimentia 27: 526, Birkhäuser Verlag, Basel (1971)

TUCZEK H.V. und RABES H.M.

Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatozyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch.Abt. B Zellpath. 15: 55-63 (1973)

WARWICK G.P.

Effect of the cell cycle on carcinogenesis. Fed.Proc. 30: 1760 - 1765 (1971)

WISHNOK J.S. and ARCHER M.C.

Structure-activity relationship in nitrosamine-carcinogenesis. Brit. J. Cancer 33: 307 - 311 (1976)

YING T.S., SARMA D.S.R. and FARBER E.

Induction of presumptive preneoplastic lesions in rat liver by a single dose of 1,2-dimethylhydrazine. Chem. Biol. Interactions 28: 363-366 (1979)

Lebenslauf

Am 7. April 1954 wurde ich als Tochter des Dipl. Ingenieurs Karl Fronius und seiner Ehefrau Margit, geb. Wirsig, in Rosenheim geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule Rosenheim-Fürstätt, von 1964 bis 1973 das Karolinengymnasium Rosenheim. Hier bestand ich 1973 das Abitur am sozialwissenschaftlichen Zweig.

Im WS 73/74 begann ich das Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Augsburg und setzte es ab SS 75 an der Ludwig Maximilians-Universität in München fort. Im SS 76 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1978, den ersten Teil des Staatsexamens im März 1979, den zweiten Teil im März 1981 und den dritten Teil im Mai 1982 ab. Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 18. Mai 1982.

Seit dem 1.10.1982 bin ich als Assistenzärztin an der Kinderabteilung des Städt. Krankenhauses Rosenheim tätig.

1979 heiratete ich Herrn Dr. med. Paul Jancso.

